

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Направление подготовки: *Химия*

Образовательная программа: *Химия*

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

*Установление пространственного строения
тритерпеноидов и их производных методом ЯМР*

Студент 2 курса

Марченко Сергей Алексеевич

Уровень/степень образования:

Магистратура

Научный руководитель:

д. х. н., доцент Селиванов С. И.

Санкт-Петербург

2018

Оглавление

Аббревиатуры и сокращения.....	3
Введение.....	4
Глава 1 Конформационный анализ тритерпеноидов методом спектроскопии ЯМР (литературный обзор)	8
1.1 Использование ЯЭО в конформационном анализе тритерпеноидов.....	9
1.2 Использование вицинальных констант ($^3J_{H-H}$) в конформационном анализе тритерпеноидов.....	12
Глава 2 Изложение результатов.....	15
2.1 Обоснование выбора изученных тритерпеноидов.....	15
2.2 Идентификация сигналов в спектрах ЯМР 1H тритерпеноидов (1)-(3).....	16
2.2.1 Идентификация сигналов в спектрах ЯМР 1H тритерпеноидов (1a) и (16).....	18
2.2.2 Идентификация сигналов в спектрах ЯМР 1H тритерпеноидов (2a) и (26).....	29
2.2.3 Идентификация сигналов в спектрах ЯМР 1H тритерпеноида (3).....	34
2.3 Использование количественных оценок ЯЭО и вицинальных констант для доказательства конформационной жесткости углеродного скелета тритерпеноида (1a).....	35
2.3.1 Применение калибровочного метода измерения скоростей кросс-релаксации ρ_{H-H} с помощью ЯЭО для тритерпеноида (1a) с учетом анизотропии диффузии, включая экспериментальную оценку параметра анизотропии D_{\parallel}/D_{\perp}	36
2.3.2 Применение вицинальных констант ($^3J_{H-H}$) для доказательства конформационной жесткости углеродного скелета тритерпеноида (1a)....	42
2.4 Использование измерения вицинальных констант ($^3J_{H-H}$) в спектрах ЯМР тритерпеноида (2a) для доказательства конформационной подвижности кольца A.....	45
2.5 Использование измерений вицинальных констант ($^3J_{H-H}$) и ЯЭО для конформационного анализа тритерпеноида (3).....	48
2.6 Заключение.....	54
Выводы	59
Экспериментальная часть.....	60
Благодарности.....	62
Список литературы.....	63
Приложения.....	67

Аббревиатуры и сокращения:

COSY – COrrelation SpectroscopY [1, p. 91]

NOESY – Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY [2,3]

FAST NOESY (F.NOESY) – Fast Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY [4,5]

HSQC – Heteronuclear Single Quantum Coherence [6]

HSQCnd – Heteronuclear Single Quantum Coherence no decoupling [6]

COLOC – COrrelation of LOng range Coupling [7]

HOESY – Heteronuclear Overhauser Effect SpectroscopY [8]

J-COSY – J-resolved COrrelation SpectroscopY [9]

DQF-COSY – Double Quantum Filter COrrelation SpectroscopY [10,11]

DEPT – Distortionless Enhancement by Polarization Transfer [1, p. 168]

qNMR – quantitative NMR [12–14]

NAMFIS – NMR analysis of molecular flexibility in solution [15]

PANIC – peak amplitude normalization for improved cross-relaxation [16,17]

CASE – Computer-Assisted Structure Elucidation [18]

IRA – Initial Rate Approximation [3]

ISPA – Isolated Spin-Pair Approximation [3]

ЯЭО – ядерный эффект Оверхаузера [3]

Me – метильная группа

ax – аксиальное положение

eq – экваториальное положение

Введение

Хорошо известно, что природные соединения обладают широким спектром биологической активности и используются как в народной медицине, так и при целенаправленном поиске новых лекарственных средств и создании (или совершенствовании известных) препаратов с высоким избирательным воздействием и низким уровнем побочных нежелательных эффектов. Несмотря на огромное разнообразие известных соединений, непосредственно выделенных из объектов окружающей среды (растений, грибов, водорослей и т.д.), в настоящее время синтезируются все новые и новые их производные. Это целиком относится к такому известному классу соединений как тритерпеноиды, которые в течение последнего времени активно синтезируются и исследуются на кафедре химии природных соединений (ХПС) Института химии СПбГУ. Например, тритерпеноиды с даммарановым скелетом (**Рис. 1а**) обладают противовоспалительной [19,20], противоопухолевой [21–23] и противовирусной активностью [24], а производные диптерокарпола влияют на индукцию антигена вируса Эпштейн-Барра [25]. Кроме того установлено, что диптерокарпол обладает цитостатической активностью, поэтому исследуется возможность его применения при лейкемии (HL60) [26,27].

Недавно были подробно исследованы эффекты глицирретовой кислоты и бетулина, которые являются тритерпеноидами с олеанановым скелетом (**Рис. 1б**). Было показано, что введение различных заместителей приводит к созданию новых метаболически устойчивых веществ, которые обладают противовирусной активностью. Установлено, что перспективными соединениями с высокой анти-ВИЧ активностью являются сукцинат 18β -глицирретовой кислоты, диметилсукцинаты и диметилглутараты (при атомах C^3 и C^{28}) бетулина [28], а диметилсукцинат бетулиновой кислоты стал основой противовирусного препарата Бевиримат, используемого против энтеровирусов [29].

Важно отметить, что даже незначительное изменение структуры и конформации тритерпеноида может существенно изменить ее биологическую активность. Это утверждение является прямым следствием связи “структура” – “свойство”, которое лежит в основе целенаправленного синтеза препаратов с избирательным действием. Поэтому получение сведений о пространственном строении новых синтетических аналогов природных соединений, а также

информации об их конформационной жесткости или конформационной лабильности является необходимым условием предсказания биологической активности этих соединений и объяснения механизма ее реализации.

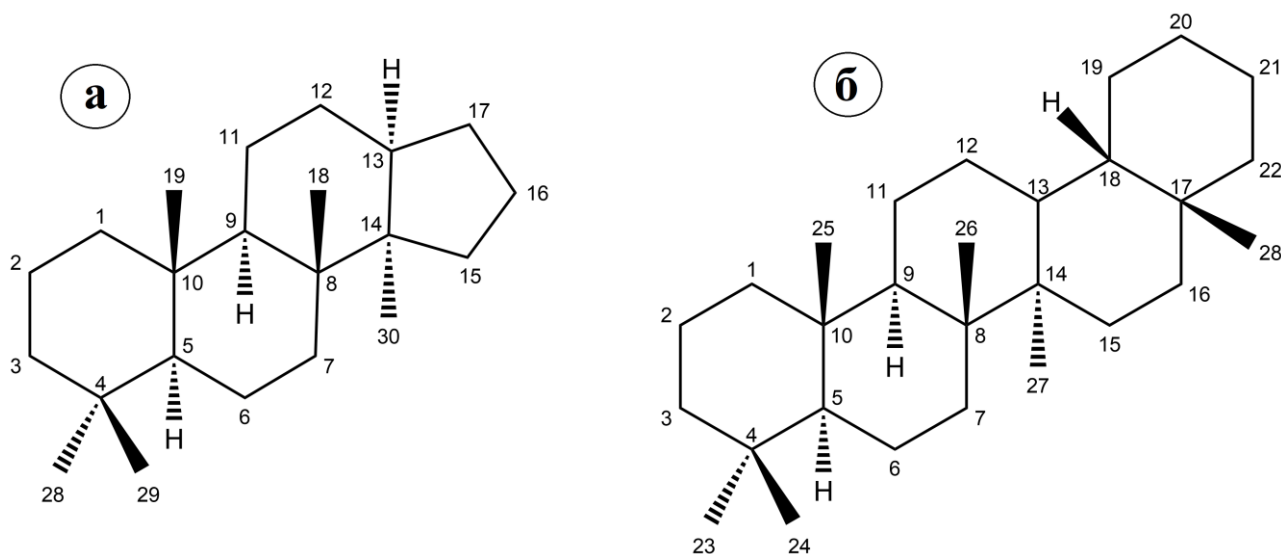


Рис. 1 Даммарановый (а) и олеанановый (б) скелет тритерпеноидов

Среди различных физико-химических методов структурного и конформационного анализа биоорганических соединений спектроскопия ЯМР занимает одно из ведущих мест. Это объясняется, прежде всего, высокой разрешающей способностью данного метода и возможностью проведения таких исследований в растворе, то есть в условиях максимально приближенных к условиям функционирования живых организмов или даже непосредственно в них (In Vivo NMR [30]).

Возможности и достоинства этого экспериментального метода хорошо известны и подробно описаны в огромном числе публикаций теоретического [31] и прикладного [32] характера. Поэтому в кратком введении необходимо отметить лишь одну тенденцию развития спектроскопии ЯМР последних лет, которая очень важна для понимания данной выпускной квалификационной работы. Она заключается в индивидуализации методологии проведения исследований с помощью корреляционных методов спектроскопии ЯМР и анализа их результатов для различных групп органических и биоорганических соединений, отличающихся между собой характером проявления и величинами спектральных и релаксационных характеристик.

Существенной особенностью настоящей работы является использование

спектроскопии ЯМР на ядрах ^1H , а в качестве основных конформационных характеристик исследованных тритерпеноидных молекул выбраны значения вицинальных констант $^3J_{\text{H-H}}$ и межпротонных расстояний $r_{\text{H-H}}$, которые сопоставлялись с соответствующими расчетными значениями. При этом во внимание принимались: молекулярный вес и анизотропия вращательной диффузии исследованных соединений, рабочая частота использованного спектрометра ЯМР (DPX-300) и времена спин-решеточной релаксации протонов, а также другие специфические факторы [3,18].

Таким образом, целью данной работы являлось: установление пространственного строения модифицированных аналогов тритерпеноидов и обнаружение быстрых в шкале времени ЯМР конформационных превращений на основе количественных оценок косвенных и прямых межпротонных взаимодействий с учетом особенностей спектральных и релаксационных характеристик этих молекул. Общая схема ЯМР-исследования тритерпеноидов представлена на Рис. 2.

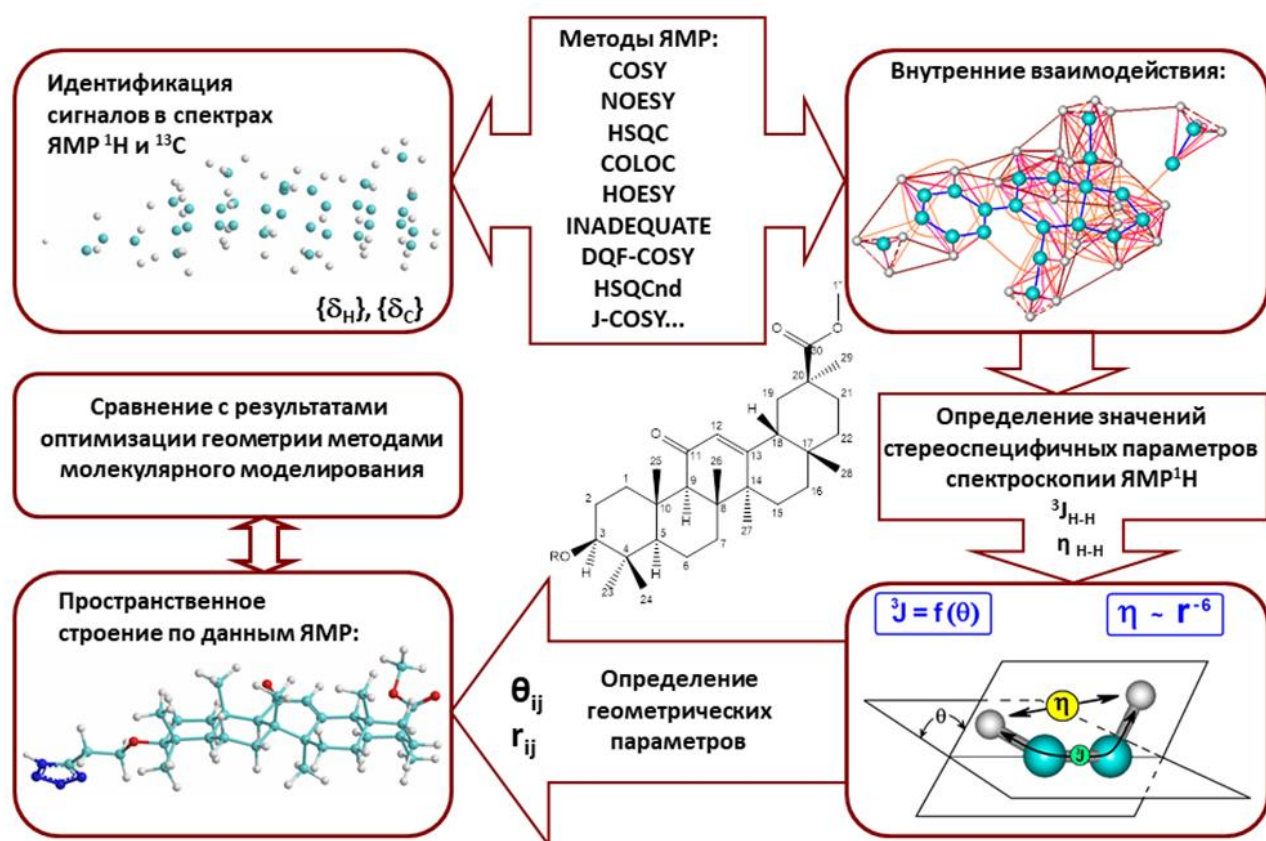


Рис. 2 Схема применения спектроскопии ЯМР в конформационном анализе тритерпеноидов

Она отражает выбранную методологию и содержит процедуру полной идентификации сигналов с помощью различных методов спектроскопии ЯМР, которая является необходимым условием для установления схем связывания протонов через скалярные и пространственные взаимодействия между ними и определения значений наиболее важных стереоспецифических параметров – вицинальных констант $^3J_{HH}$ и скоростей кросс-релаксации σ_{H-H} . Затем следует процедура перевода этих характеристик в соответствующие диэдральные углы θ на основании Карплусовской зависимости $^3J_{H-H} = f(\theta)$ и межпротонные расстояния r_{H-H} на основании зависимости $\sigma_{H-H} \sim \tau_c r^{-6}$, где τ_c – время корреляции вращательной диффузии молекулы тритерпеноида в растворе. На последнем этапе экспериментальные оценки этих характеристик сопоставляются с соответствующими данными расчетных методов и на основании степени их соответствия (или несоответствия) делается вывод о конформационной жесткости (или лабильности) изучаемых тритерпеноидов. Все перечисленные этапы исследования подробно изложены и обсуждены в литературном обзоре и в соответствующих разделах настоящей работы.

Глава 1

Конформационный анализ тритерпеноидов методом спектроскопии ЯМР (литературный обзор)

Начиная с середины 70-х годов прошлого века использование набора химических сдвигов ядер ^{13}C являлось основным средством решения задач по идентификации структуры тритерпеноидов [33]. При таком подходе необходимы литературные данные по отнесению сигналов ядер ^{13}C в спектрах ЯМР известных и уже описанных ранее соединений и/или расчеты их химических сдвигов [34]. Основным недостатком такого подхода является возможность ошибок в отнесении углеродных сигналов из-за излишней уверенности в данных литературных источников и из-за слишком близкого расположения в спектре сигналов, принадлежащих однотипным спиновым системам, таких как группы CH , CH_2 или CH_3 , а также из-за ограниченной точности расчетных данных и невозможности полного учета влияния растворителя, концентрации и температуры образца на расчетные значения химических сдвигов $\delta(^{13}\text{C})$. Но самым главным недостатком является то, что на основании значений химических сдвигов ядер ^{13}C невозможно получить количественную информацию о пространственном строении изучаемого тритерпеноида, необходимую для сравнения ее с данными других методов, таких как рентгеноструктурный анализ (РСА) или молекулярное моделирование (ММ). Таким образом, в случае использования спектроскопии ЯМР ^{13}C конформационный анализ носит качественный характер, степень эффективности использования которого фактически зависит от наличия достоверной базы данных $\{\delta(^{13}\text{C})\}$ для конкретного типа соединений. Еще более проблематичным является доказательство с помощью $\delta(^{13}\text{C})$ существования быстрых в шкале времени ЯМР конформационных динамических равновесий, поскольку в этом случае все наблюдаемые спектральные параметры оказываются усредненными во времени и для корректного описания даже простейшего случая двухпозиционного обмена необходимо знание величин относительных населенностей конформеров, которые могут быть получены с помощью расчетов полных энергий наиболее устойчивых конформаций.

Одним из возможных путей решения всех указанных проблем спектроскопии ЯМР на ядрах ^{13}C является переход к активному использованию возможностей более чувствительной спектроскопии ЯМР на ядрах ^1H . В этих спектрах содержится прямая

информация о пространственном строении молекул в растворе в виде вицинальных констант ${}^3J_{\text{H-H}}$, связанных с диэдральными углами θ_{ij} , и гомоядерных эффектов Оверхаузера, связанных с межпротонными расстояниями r_{ij} (Рис. 3).

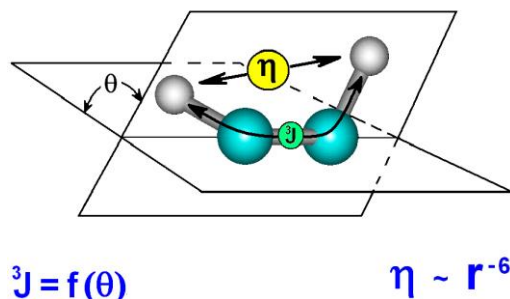


Рис. 3 Зависимость вицинальных констант (${}^3J_{\text{H-H}}$) от диэдрального угла ($\theta_{\text{H-H}}$) и ЯЭО ($\eta_{\text{H-H}}$) от межпротонного расстояния r .

1.1 Использование ЯЭО в конформационном анализе тритерпеноидов

ЯЭО активно используется на количественном уровне для определения межъядерных расстояний для больших биоорганических молекул [35,36]. Для малых молекул он оказывается слабее, чем для больших молекул. Этот факт связан с соотношением вероятностями нульквантовых (W_0), одноквантовых (W_1) и двухквантовых (W_2) релаксационных переходов. На Рис. 4 показана зависимость вероятностей этих переходов от произведения Ларморовой частоты ω_0 и времени корреляции τ_c . Для низкомолекулярных соединений преобладает вероятность двухквантовых переходов, а для высокомолекулярных – вероятность нульквантовых переходов. Для больших молекул выполняется соотношение $\omega_0\tau_c \gg 1$ и ЯЭО в условиях предела спиновой диффузии может достигать 100%, что следует из следующего соотношения:

$$\eta_{\text{ЯЭО}} = (W_2 - W_0) / (W_2 + 2W_1 + W_0)$$

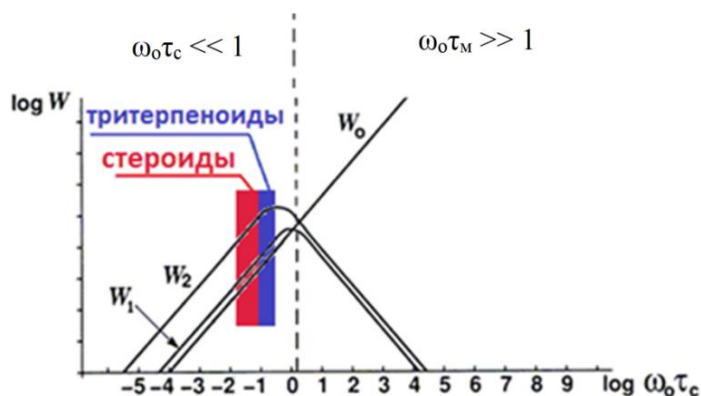


Рис. 4 Зависимость вероятностей релаксационных переходов W_0 , W_1 и W_2 от $\omega_0\tau_c$

Предел экстремального сужения линий ($\omega_0\tau_c \ll 1$) характерен для малых молекул и ЯЭО в этом случае не превышает 50%. Для соединений с молекулярным весом около 500 Da, таких как тритерпеноиды, произведение $\omega_0\tau_c$ может оказаться близким к единице.

Недавно была показана возможность точного количественного определения межпротонных расстояний для стероидов, которые являются соединениями, структурно-близкими к тритерпеноидам [37–39]. В этих работах использовались относительные (а не абсолютные) интенсивности кросс-пиков в спектре NOESY. Тогда приведенные интегральные интенсивности представляют собой линейную зависимость от времени смешивания τ_m и не зависят от релаксационного затухания сигналов. Следовательно, искомая скорость кросс-релаксации σ_{ij} может быть определена как тангенс угла наклона этой линейной зависимости к оси ординат. Кроме того, в этих исследованиях вводилась поправка на анизотропию диффузии молекулы. Параметр анизотропии определялся с помощью сопоставления гетероядерных (^1H - ^{13}C) эффектов Оверхаузера в метиленовой группе CH_2 . В результате были получены данные о межпротонных расстояниях с точностью не хуже $\pm 5\%$.

Из-за различия между молекулярными массами стероидов и тритерпеноидов время корреляции диффузии в случае вторых из них должно увеличиваться, а условие выполнения экстремального сужения линии ($\omega_0\tau_c \ll 1$) при этом ослабевает. Следовательно, это должно приводить к уменьшению времен продольной (T_1) и поперечной (T_2) релаксации тритерпеноидов по сравнению со стероидами (Рис. 5). В результате это ведет с одной стороны к сокращению времени намагничивания тритерпеноидов (можно быстрее повторять накопление), а с другой – к увеличению естественной ширины линий в их спектрах и потере разрешающей способности, особенно при работе на высоких рабочих частотах.

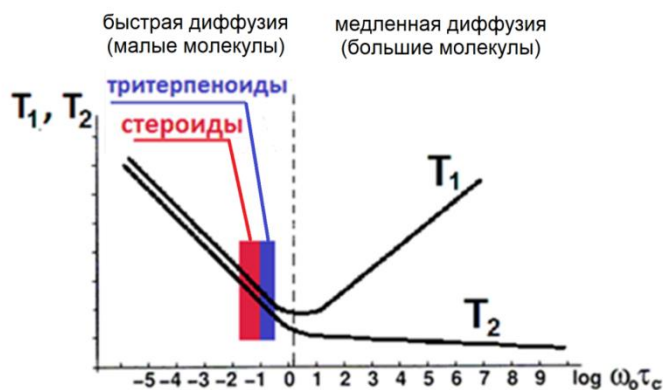


Рис. 5 Зависимость времен T_1 и T_2 от параметра $\omega_0\tau_c$

На **Рис. 6** показана зависимость ЯЭО от произведения $\omega_0\tau_c$. Важно отметить, что ЯЭО чувствителен не только к расстояниям, но еще зависит от времени корреляции диффузии τ_c и рабочей частоты спектрометра ω_0 . На величину τ_c влияют вязкость растворителя, температура образца и размеры молекулы. Следовательно, для уменьшения риска попадания в область нелинейности, в которой ЯЭО может обратиться в нуль или даже изменить знак, лучше всего работать в невязких растворителях при повышенных температурах и использовать спектрометр с невысокой рабочей частотой. Поэтому характерные диапазоны времен корреляций для стероидов и тритерпеноидов на графиках, представленных на **Рис. 4 – 6**, даны для спектрометра с рабочей частотой 300 МГц.

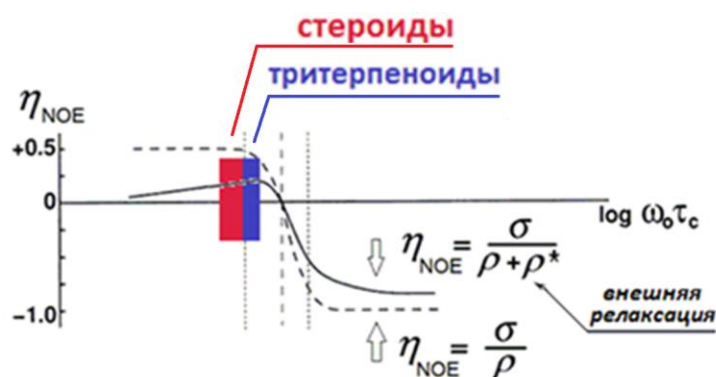


Рис. 6 Зависимость ЯЭО от Ларморовой частоты

Для точной оценки межпротонных расстояний необходимо интегрировать кросс-пики в спектре NOESY с достаточно высокой точностью. Для этого проводится длительное накопление, при котором получается приемлемое соотношение сигнал/шум. При таком накоплении необходимо соблюдать требование для полного

релаксационного восстановления сигнала. Следовательно, релаксационная задержка $D1$ должна превышать $5T_1^{\max}$, где T_1^{\max} – максимальное время продольной релаксации среди всех протонов. Для тритерпеноидов время T_1 в невязких растворителях ($CDCl_3$) на резонансных частотах (300 – 500) МГц обычно оказывается в пределах от 0.1 до 1.0 с. Следовательно, период повторения экспериментов по измерению ЯЭО в случае тритерпеноидов должен быть не менее 5.0 с. В результате общая продолжительность эксперимента NOESY может превышать 24 часа.

Для решения этой проблемы в работах [4,5] был предложен метод F.NOESY. В этом методе фиксировалось общее время эксперимента для различных значений τ_m . Это позволили авторам избавиться от систематических вкладов, вносимых внешней релаксацией в погрешность измерения объемных интегралов. Вклад в погрешность, связанный с неполной релаксацией спинов, в этих экспериментах не превышал $\pm 3\%$.

1.2 Использование вицинальных констант ($^3J_{H-H}$) в конформационном анализе тритерпеноидов

Вторым мощным инструментом для конформационного анализа является использование вицинальных констант. В далеком 1959 году Карплус впервые обнаружил зависимость $^3J_{H-H}$ от торсионного угла θ [40]. Эмпирическое уравнение Карплуса имело следующий вид:

$$^3J_{H-H} = A + B\cos\theta + C\cos 2\theta,$$

где A, B, C – коэффициенты, θ – торсионный угол.

На сегодняшний день известно большое число модификаций этого уравнения, дающие более точные значения $^3J_{H-H}$. Как правило, такие модификации предназначены для определенного класса соединений или для определенного диапазона торсионных углов. Уравнение HLA (Haasnoot C. A. G., Leeuw F. A. A. M., Altona C.) – наиболее популярная модификация, применяемая для соединений, содержащих циклогесканы кольца [41]:

$$^3J(\theta) = P_1\cos^2\theta + P_2\cos\theta + P_3 + \sum \Delta\chi_i(P_4 + P_5\cos^2(\xi_i\theta + P_6|\Delta\chi_i|)),$$

где $\Delta\chi_i$ – групповая электроотрицательность $\Delta\chi_i^{\text{груп.}}$, которая определяется с помощью атомных электроотрицательностей Хьюгинса в α - и β -положениях i -го заместителя в этановом фрагменте: $\Delta\chi_i^{\text{груп.}} = \Delta E\chi_i^\alpha - P_7\Delta E\chi_i^\beta$; $P_1 - P_7$ – подстроечные эмпирические

параметры; ξ_i – численный коэффициент: $\xi_i = 1$ для области $0^\circ < \theta_i < 180^\circ$, $\xi_i = -1$ для области $180^\circ < \theta_i < 360^\circ$. Альтона и соавторы предложили несколько вариантов уравнения, которые отличаются значениями параметров P_i , оптимизированных для различного количества заместителей, а также с учетом и без учета эффектов заместителей в β -положениях этанового фрагмента.

В спектрах ЯМР ^1H большинство сигналов алифатических протонов имеют сложную мультиплетную структуру. Следствием этого является сложность прямого измерения вицинальных констант. Поэтому в настоящей работе дополнительно использовались данные о мультиплетной структуре кросс-пиков в фазочувствительном спектре DQF-COSY и анализ спектров J-COSY, а также результатов селективных экспериментов $^1\text{H}\{^1\text{H}\}$, позволяющих упростить мультиплетную структуру протонных сигналов.

В настоящей дипломной работе направление ЯМР-исследования тритерпеноидов с преимущественным использованием спектральных и релаксационных характеристик ядер ^1H было выбрано в качестве основного подхода. Наиболее стереоспецифические из этих характеристик – вицинальные константы ($^3J_{\text{H-H}}$) и скорости кросс-релаксации ($\sigma_{\text{H-H}}$), были использованы для количественных оценок геометрических параметров исследованных тритерпеноидов – диэдральных углов $\theta_{\text{H-H}}$ и межпротонных расстояний $r_{\text{H-H}}$.

В качестве основной цели данного исследования было выбрано установление с помощью спектроскопии ЯМР пространственного строения модифицированных аналогов тритерпеноидов и обнаружение быстрых в шкале времени этого спектрального метода конформационных превращений на основе количественных оценок косвенных и прямых межпротонных взаимодействий с учетом особенностей спектральных и релаксационных характеристик этих молекул.

Для достижения этой цели были последовательно решены следующие задачи:

- на основании литературных данных, опыта изучения структурно похожих стероидных и других молекул, а также предварительной оценки релаксационных характеристик выявлены основные проблемы использования спектроскопии ЯМР ^1H в конформационном анализе тритерпеноидов;

- выбраны модельные тритерпеноиды, на примере исследования которых, проведена апробация данной методологии для доказательства их конформационной жесткости или лабильности;
- проведена полная идентификация сигналов в спектрах ЯМР ^1H модельных тритерпеноидов в условиях их значительного перекрытия и возможного образования сильносвязанных спиновых систем;
- определены точные значения наиболее важных для конформационного анализа ЯМР-характеристик – вицинальных констант $^3J_{\text{H-H}}$ и скоростей кросс-релаксации $\sigma_{\text{H-H}}$;
- проведено сопоставление экспериментальных и расчетных вицинальных констант $^3J_{\text{H-H}}$ и межпротонных расстояний $r_{\text{H-H}}$ для установления конформационной жесткости или обнаружения конформационной мобильности модельных тритерпеноидов;
- получена экспериментальная оценка параметра анизотропии вращательной диффузии D_{\parallel}/D_{\perp} для тритерпеноида (**1a**) в растворе CDCl_3 с помощью гетероядерных эффектов Оверхаузера в группе C^{21}H_2 ;
- В условиях выполнения приближений начальных скоростей (IRA) и изолированности спиновых пар (ISPA) с использованием данных F.NOESY экспериментов, полученных при различных временах смешивания τ_m и с применением приведенных к диагональным значений интегральных интенсивностей кросс-пиков (PANIC), и калибровочного метода расчета с применением внутреннего эталонного расстояния, а также с учетом анизотропности диффузии, для тритерпеноида (**1a**) получены значения скоростей кросс-релаксации $\sigma_{\text{H-H}}$ для 14 пар протонов, расстояния между которыми при выборе эталонного значения 1.76 Å для геминальных протонов в группе C^{19}H_2 в пределах $\pm 5\%$ совпадает с расчетными значениями, полученными методом MM2.

Глава 2. Изложение результатов

2.1 Обоснование выбора изученных тритерпеноидов.

Метод спектроскопии ЯМР позволяет изучать строение самых различных соединений. В данной работе в качестве объектов исследования были выбраны тритерпеноиды с даммарановым и олеанановым скелетами. Эти соединения имеют широкое применение в медицине, но работы по изучению тритерпеноидов методом ЯМР, как правило, ограничиваются частичным отнесением отдельных сигналов в спектре ^1H и полным отнесением сигналов в спектре ^{13}C . Поэтому одной из задач данной работы являлось полное и независимое отнесение всех сигналов в спектрах ЯМР ^1H двух разных типов модельных тритерпеноидов. С другой стороны эти модельные соединения имеют ряд структурных и конформационных различий. Например, тритерпеноиды **(1a)** и **(1б)** были использованы для исследования критериев жесткости (или лабильности) углеродного скелета этих молекул, а также для проведения конформационного анализа на количественном уровне.

Тритерпеноид **(2a)**, согласно предварительным расчетам методом MM2, может существовать в растворе в двух конформациях, а тритерпеноид **(2б)** только в одной, поэтому они были выбраны для экспериментального ЯМР-доказательства наличия (или отсутствия) такого динамического обмена. Тритерпеноид **(3)**, по сравнению с тритерпеноидами **(2)**, имеет два объемных заместителя в положении 2. На примере этого соединения изучалось возможность экспериментального доказательства влияния указанных заместителей на конформацию тритерпеноида в области кольца А, а также исследовался вопрос о конформационной подвижности самих заместителей.

Структуры соединений **(1) – (3)** представлены на **Рис. 7** и имеют следующие названия по номенклатуре ИЮПАК:

(1a) – метиловый эфир 3-О-[2-(1*H*-тетразол-5-ил)этил]-11-оксоолеан-12-ен-30-овой кислоты

(1б) – метиловый эфир 3-О-(2-Цианоэтил)-11-оксоолеан-12-ен-30-овой кислоты

(2a) – ((20(S),24(R))-20,24-эпокси-24-метил-даммаран-3-он

(2б) – ((20(S),24(R))-20,24-эпокси-24-метил-даммаран-3 α -ол

(3) – 20(S)-2,2-бис[2-(1*H*-тетразол-5-ил)этил]-20-гидроксидаммар-24-ен-3-он

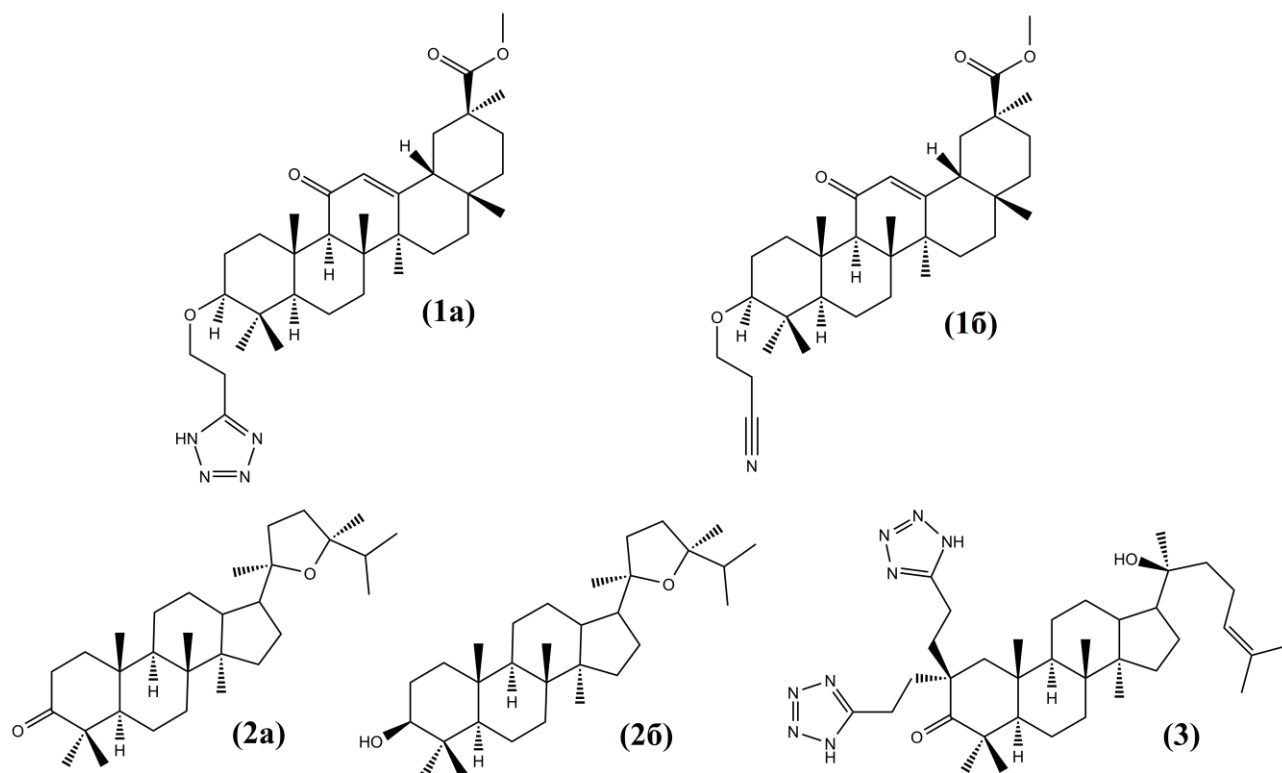


Рис. 7 Структуры соединений (1) - (3)

2.2 Идентификация сигналов в спектрах ЯМР ^1H тритерпеноидов (1) – (3).

Спектры ЯМР ^1H соединений (1) – (3) представлены на Рис. 8 на котором хорошо видна характерная для тритерпеноидов перегруженность алифатической области в интервале 0.7 – 2.5 м.д. В процессе обработки представленных спектров во временной области в качестве функции аподизации сигнала свободной индукции использовалось Лоренц-Гауссово преобразование [42]. Это позволило получать достаточно полную информацию о мультиплетности части сигналов, которые располагались в спектре отдельно от других, а структура сигналов в перекрывающейся области заметно упрощалась и становилась более понятной даже в простом одномерном спектре ЯМР ^1H .

В этом можно убедиться на примере приведенных в прямоугольных рамках отдельных или перекрывающихся сигналов. Например, для соединения (1a) показана область, в которой располагаются мультиплетные сигналы 6-ти (согласно интегрированию) протонов, а для соединения (16) представлен заметно уширенный из-за дальних скалярных взаимодействий сигнал протона 12 при 5.65 м.д. в сравнении с узким сигналом растворителя ($\text{CHCl}_3/\text{CDCl}_3$) при 7.26 м.д. (на Рис. 8 они приведены в одном масштабе).

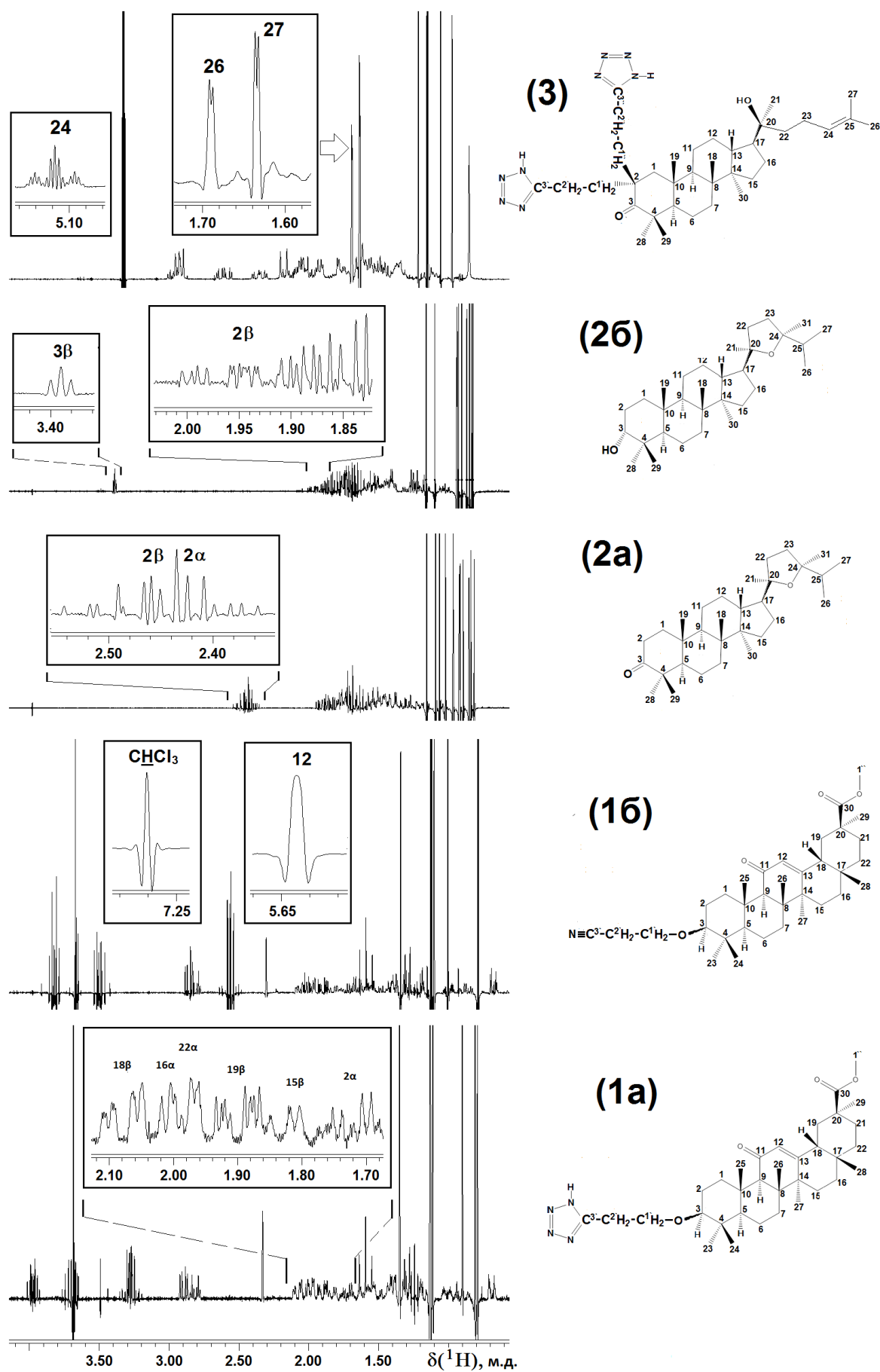


Рис. 8 Спектры ЯМР ¹H тритерпеноидов (1) – (3), полученные на частоте 300 МГц при нормальных условиях в CDCl₃ – для соединений (1), (2), а в случае соединения (3) – в CD₃OD

В спектре соединения (**2a**) в рамке хорошо видны мультиплетные структуры сигналов геминальных протонов в положении 2 (~2.45 м.д.), имеющих хорошо выраженный так называемый эффект крыши (“roof”-effect) и свидетельствующие об их сильносвязанности по геминальной константе $^2J_{2\alpha-2\beta}$.

В спектре соединения (**2b**) в рамках показаны характерный триплетный сигнал экваториального протона 3β при 3.40 м.д. и часть сигнала аксиального протона 2β при 1.95 м.д., имеющего четыре скалярных взаимодействия с протонами 3β , 2α , 1α и 1β . Хорошо видны две небольшие и неравные между собой константы $^3J_{2\beta-3\beta}$ и $^3J_{2\beta-1\beta}$, а также две большие и неравные между собой константы $^2J_{2\beta-2\alpha}$ и $^3J_{2\beta-1\alpha}$.

Наконец, для соединения (**3**) показана сложная мультиплетная структура сигнала метинового протона 24 при 5.11 м.д. и дублетные сигналы двух соседних (*цис*- и *транс*-ориентированных) метильных групп Me26 (1.69 м.д.) и Me27 (1.64 м.д.), имеющих с протоном 24 две неодинаковых по величине дальние константы: $^4J_{\text{Me26-24}} = 1.2$ Гц и $^4J_{\text{Me27-24}} = 1.4$ Гц, соответственно. Следует отметить, что дополнительное уширение сигнала метильной группы Me26 при 1.69 м.д. по сравнению с аналогичным сигналом Me27 при 1.64 м.д. связано с гомоаллильным скалярным взаимодействием между протонами Me26 и метиленовыми протонами в положении 23, которое отсутствует (или значительно меньше) для *транс*-ориентированной метильной группы Me27. Следовательно, сигнал метильных протонов Me26 представляет собой дублет триплетов с соответствующими константами $^4J_{\text{Me26-24}} = 1.2$ Гц и $^5J_{\text{Me26-23}} \approx 0.7$ Гц.

Дальнейший анализ протонных спектров соединений (**1**) – (**3**) невозможен без привлечения дополнительных экспериментальных данных гомо- и гетероядерных методов спектроскопии ЯМР.

2.2.1 Идентификация сигналов в спектрах ЯМР ^1H тритерпеноидов (**1a**) и (**1b**)

Тритерпеноиды (**1a**) и (**1b**), принадлежащие олеанановому ряду, отличаются лишь заместителем R в положении 3β ($R_{3\beta}^{(1a)}$ – тетразолилэтокс группа; $R_{3\beta}^{(1b)}$ – цианоэтокс группа). Они имеют похожие, но не абсолютно одинаковые спектры ЯМР ^1H и ^{13}C . Даже протоны углеродного скелета молекул (**1a**) и (**1b**), находящиеся в кольцах A, B, C, D и E, имеют небольшие, но вполне регистрируемые, различия химических сдвигов. В результате этого имеется возможность перепроверки результатов отнесений сигналов в спектре одного из этих соединений, в котором

положение перекрывающихся сигналов и его мультиплетная структура не так очевидна и ясна для понимания, как в спектре ЯМР ^1H второго из этих тритерпеноидов¹. Аналогичное заключение можно сделать и в отношении точного измерения скалярных констант и ЯЭО, поскольку эти параметры отражают пространственное строение углеродного скелета молекул (**1a**) и (**16**), которые идентичны.

Прежде чем приступить к анализу наиболее сложной алифатической области спектров ЯМР ^1H соединений (**1a**) и (**16**), кратко опишем сигналы, находящиеся в более простой для интерпретации области 2.5 – 6.0 м.д. Здесь наиболее очевидным является отнесение сигналов при 5.69 м.д. для (**1a**) и 5.64 м.д. для (**16**) метиновому протону 12. Этот протон играет ключевую роль при идентификации сигналов протонов колец А – Е, поскольку взаимодействует через пространство (ЯЭО) с мостиковым протоном 18 β (2.08 м.д.), принадлежащим кольцам D и E и с мостиковым протоном 9 α (2.33 м.д.), принадлежащим кольцам B и C, а также с протоном 19 β (1.90 м.д.) кольца E и протонами метильной группы Me26 (1.11 м.д.). Эти взаимодействия хорошо видны на нижнем фрагменте спектра NOESY соединения (**1a**), показанного на **Рис. 9**. Таким образом, протон 12 является наиболее важным элементом построения схемы связывания между протонами, расположенными в разных частях молекул (**1a**) и (**16**).

Отнесения протонных сигналов тетразолилэтоксид и цианоэтоксид групп в соединениях (**1a**) и (**16**) также не представляют особых затруднений, поскольку они образуют изолированную четырехспиновую систему и легко обнаруживаются с помощью кросс-пиков между всеми сигналами в соответствующих спектрах COSY-DQF. Окончательная их принадлежность, включая пространственную ориентацию заместителя R_{3 β} по отношению к кольцу А и всех протонов фрагмента –O–C¹H₂–C²H₂– по отношению друг к другу, определялась с помощью пространственных взаимодействий протонов метиленовой группы C¹H₂ с ближайшими к ним протонами 2 α и 3 α , а также подтверждалась отсутствием аналогичных пространственных

¹ В качестве примера можно привести сравнительный анализ узкого участка спектра 0.8 – 1.1 м.д. тритерпеноидов (**1a**) и (**16**), в котором находятся мультиплетные сигналы двух протонов 1 α и 16 β , а также интенсивный синглетный сигнал протонов метильной группы 24, находящейся в кольце А. В спектре ЯМР ^1H соединений (**1a**) сигнал этой метильной группы перекрывается с сигналом протона 1 α (см. **Рис. 8**), а в спектре соединения (**16**) – с сигналом протона 16 β . Следовательно, в первом случае хорошо видна тонкая мультиплетная структура дублетного сигнала протона 16 β , а во втором – триплетного сигнала протона 1 α .

взаимодействий для протонов метиленовой группы C^2H_2 (см. средний фрагмент спектра NOESY соединения (1a) на Рис. 9). К этому следует добавить, что обе пары метиленовых протонов оказываются диастереотопными и, следовательно, химически неэквивалентными. Поэтому есть возможность их пространственной идентификации как с помощью вицинальных констант, так и с помощью ЯЭО. На Рис. 9 эти протоны обозначены с помощью буквенных индексов “a”, “b” – для протонов C^1H_2 , “c” и “d” – для протонов C^2H_2 . При этом переходы “a” → “b” и “c” → “d” выполняются по часовой стрелке и по кратчайшему пути (т.е. поворот на $+120^\circ$, если смотреть вдоль связи $O-C^1$ и C^1-C^2 , соответственно).

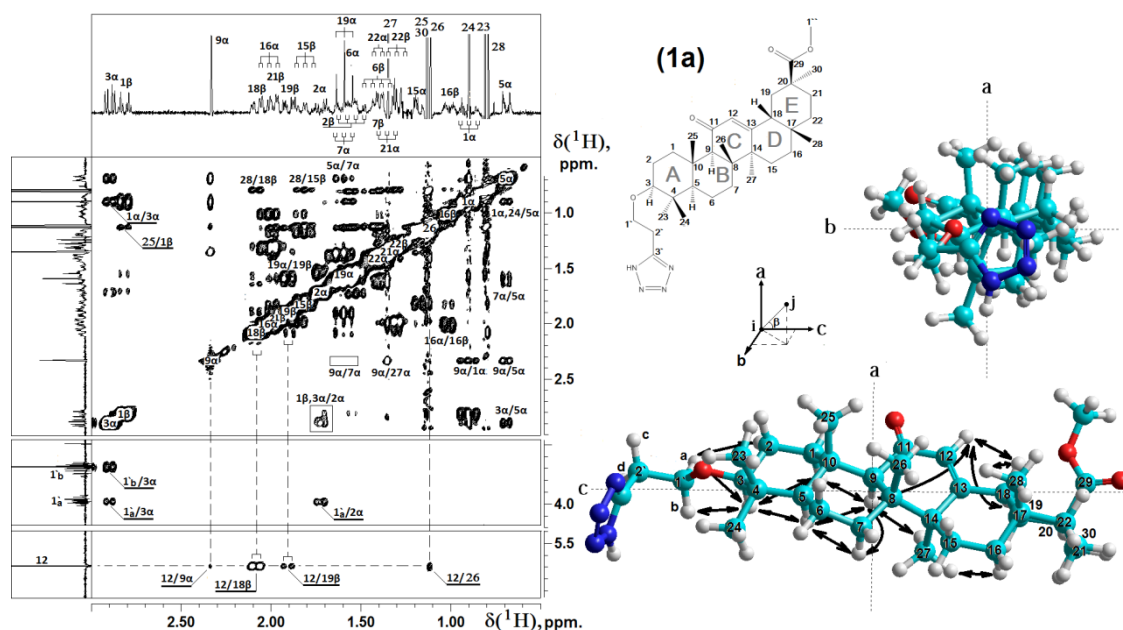


Рис. 9 Фрагменты спектра NOESY тритерпеноида (1a), полученного при $\tau_m = 0.2$ с на частоте 300 МГц. Справа показаны проекции “вдоль” и “ортогонально” главной оси “с” преимущественной конформации этой аксиально-симметричной молекулы. На второй из них двойными стрелками показаны наиболее важные прямые диполь-дипольные взаимодействия (ЯЭО), которые были обнаружены в этом спектре.

Сигнал протона 9α имеет уширенную синглетную структуру и находится в свободной от перекрывания области спектра при 2.33 м.д. Этот протон имеет три достаточно интенсивных пространственных взаимодействия в α -области молекулы с протонами 5α (0.68 м.д.), 1α (0.90 м.д.) и с протонами метильной группы Me_{27} (1.34 м.д.), а также довольно слабое взаимодействие с протоном 7α (1.64 м.д.), положение кросс-пика которого показано на спектре NOESY с помощью прямоугольной рамки (кросс-пика не видно из-за его малой интенсивности).

Таким образом, с помощью ЯЭО протонов 12 и 9α , которые легко идентифицируются в спектре, благодаря синглетной структуре их сигналов и

характерным химическим сдвигам, обнаружены три сигнала протонов кольца В (5 α , 7 α , 9 α), два сигнала протонов кольца Е (18 β , 19 β) и один сигнал протона кольца А (1 α). Кроме того, отсутствие кросс-пика между синглетными сигналами двух метильных групп (Me26, Me27) свидетельствует об их взаимном “*транс*”-расположении относительно связи C⁸–C¹⁴. К этому следует добавить, что практически все сигналы идентифицированных протонов почти (или полностью) не перекрываются с другими сигналами и их мультиплетная структура хорошо видна в спектре. Это обстоятельство значительно облегчает установление их принадлежности к экваториальным или аксиальным протонам, а также упрощает поиск в спектре ЯМР ¹H сигналов других протонов с помощью скалярных или пространственных взаимодействий с ними.

Следует отметить, что идентифицированные протоны входят в состав четырех разных спиновых подсистем и только для двух оставшихся спиновых подсистем, включающих протоны кольца D (–C¹⁵H₂–C¹⁶H₂–) и кольца Е (–C²¹H₂–C²²H₂–), не обнаружено ни одного протона. Это наиболее просто сделать, воспользовавшись дальними скалярными взаимодействиями “W”-типа между протонами 18 β и 16 β , 19 β и 21 β . На **Рис. 10** приведены результаты экспериментов по селективной гомоядерной развязке скалярных взаимодействий ¹H{¹H}. Хорошо видно (см. **Рис. 10-3**), что при облучении мультиплетного сигнала, находящегося при 1.01 м.д., сигнал протона 18 β меняет свою мультиплетность и становится дублетом дублетов (дд). Одновременно с этим изменяется мультиплетность сигнала при 1.82 м.д., который из триплета дублетов (тд) с сильно уширенными компонентами превращается в триплет (т), соответствующий двум большим (~ 13 Гц) константам. Первое из этих наблюдений доказывает принадлежность облучаемого сигнала экваториальному протону 16 β , а второе свидетельствует о том, что триплет-дублетный сигнал принадлежит аксиальному протону 17 α . Этот протон в свою очередь взаимодействует по скалярному механизму с протонами метильной группы Me27, поскольку при их селективном облучении (см. **Рис. 10-4**) все шесть компонент сигнала 15 α заметно сужаются.

Наконец, в эксперименте по селективному двойному резонансу, показанному на **Рис. 10-5**, при облучении сигнала протона 18 β при 1.82 м.д. на сигнале протона 19 β при 1.90 м.д. наблюдается исчезновение одного дублетного расщепления величиной

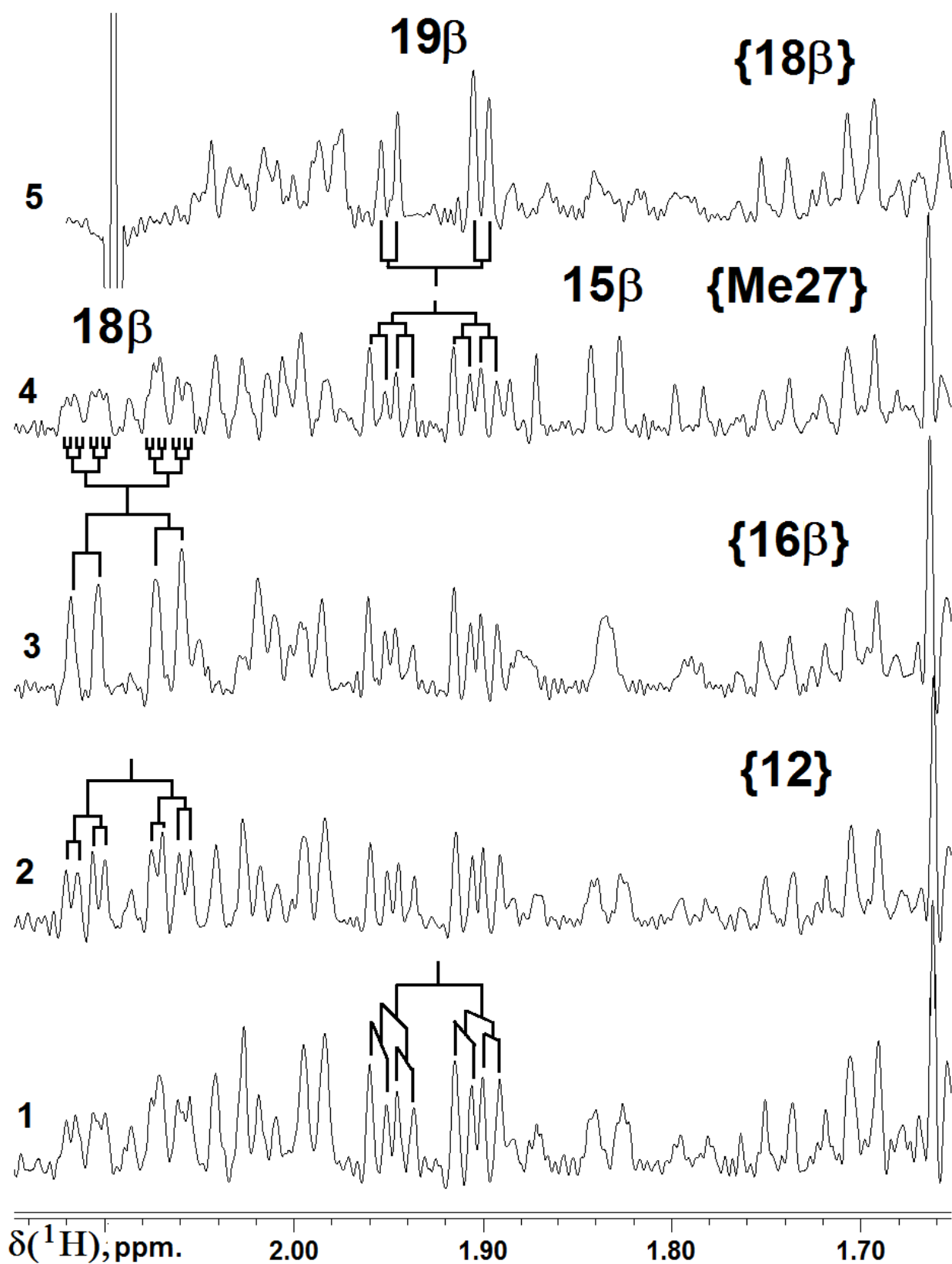


Рис. 10 Фрагмент спектра ЯМР ^1H тритерпеноида (**1a**), полученный без дополнительного облучения (1) и при селективном облучении сигналов протона 12 при 5.69 м.д. (2), протона 16 β при 1.01 м.д. (3), протонов метильной группы Me27 (4) и протона 18 β при 2.08 м.д. (5). На спектрах показана мультиплетная структура избранных сигналов.

4.4 Гц и в спектре $^1\text{H}\{18\beta\}$ остается дублет дублетный сигнал с двумя разными по величине константами: $^4J_{19\beta-21\beta} = 2.7$ Гц, $^2J_{19\beta-19\alpha} = 13.7$ Гц. Следовательно, наличие дальней “W”-типа константы 2.7 Гц позволяет обнаружить сигнал экваториального протона 21β при 1.99 м.д. Однако, провести эксперимент по селективной развязке между протонами 19β и 21β , невозможно из-за слишком близкого их взаимного расположения ($\Delta\nu_{19\beta-21\beta} = 27$ Гц). Но это взаимодействие совершенно явным образом (см. мультиплетность сигнала 19β на **Рис. 10-1**) подтверждается хорошо наблюдаемым эффектом крыши по константе 2.7 Гц, точно также как и по константе 4.4 Гц.

Полученные выше результаты отнесений сигналов в спектре ЯМР ^1H тритерпеноида (**1a**) были использованы для идентификации других сигналов в каждой из спиновых систем, которые представлены на **Рис. 11**.

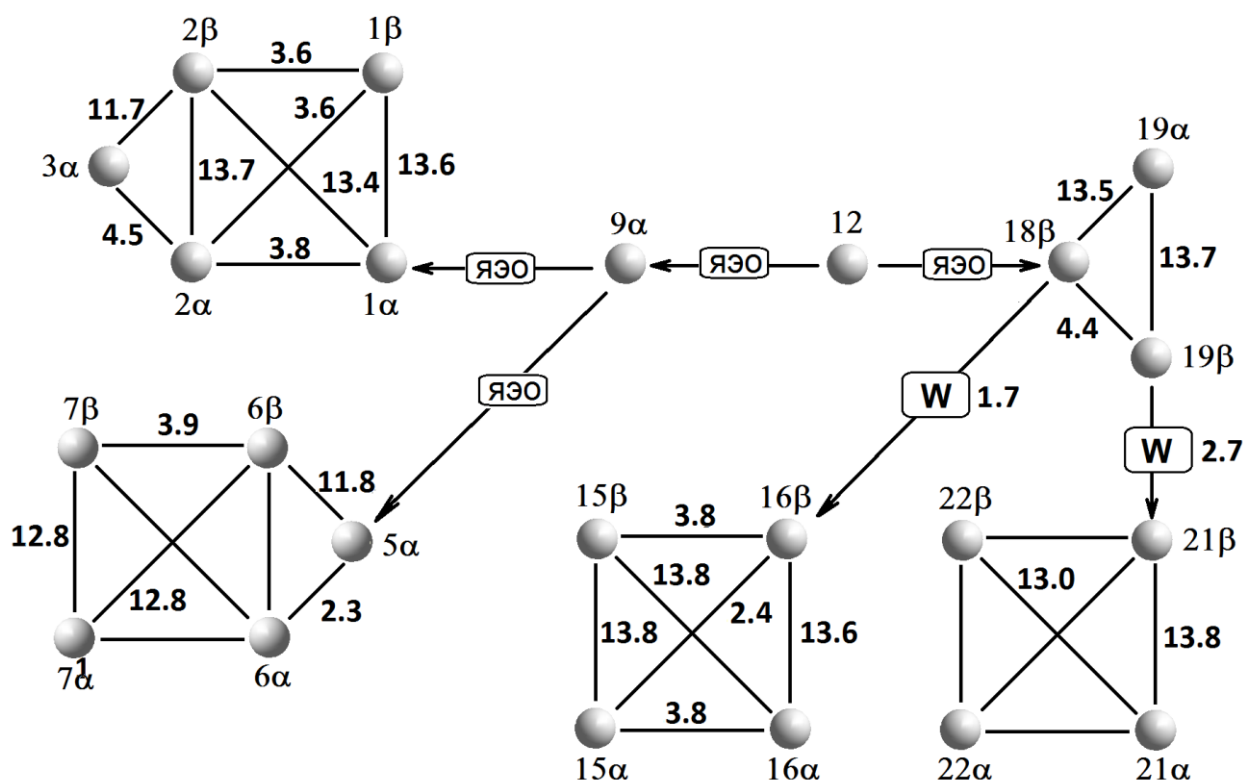


Рис. 11 Схемы связывания протонов колец А, В, С, D и Е тритерпеноида (**1a**) через косвенные и прямые взаимодействия. Цифрами указаны величины (в Гц) геминальных и вицинальных констант $^{2,3}J_{\text{H-H}}$. W – дальние скалярные взаимодействия “W”-типа: $^4J_{18\beta-16\beta} = 1.7$ Гц; $^4J_{19\beta-21\beta} = 2.7$ Гц

Для этого использовались данные спектра DQF-COSY, фрагмент алифатической области которого показан на **Рис. 12**, а также спектров NOESY (**Рис. 9**) и J-COSY (**Рис. 13**). Одновременно с отнесением сигналов из спектров DQF-COSY

и J-COSY была получена информация о величинах скалярных констант $^{2-4}J_{H-H}$, точное измерение которых проводилось с учетом более разрешенного (в цифровом отношении) спектра ЯМР 1H . Их экспериментальные значения (в Гц) приведены на соответствующих схемах связывания спиновых подсистем колец А – Е на **Рис. 11**.

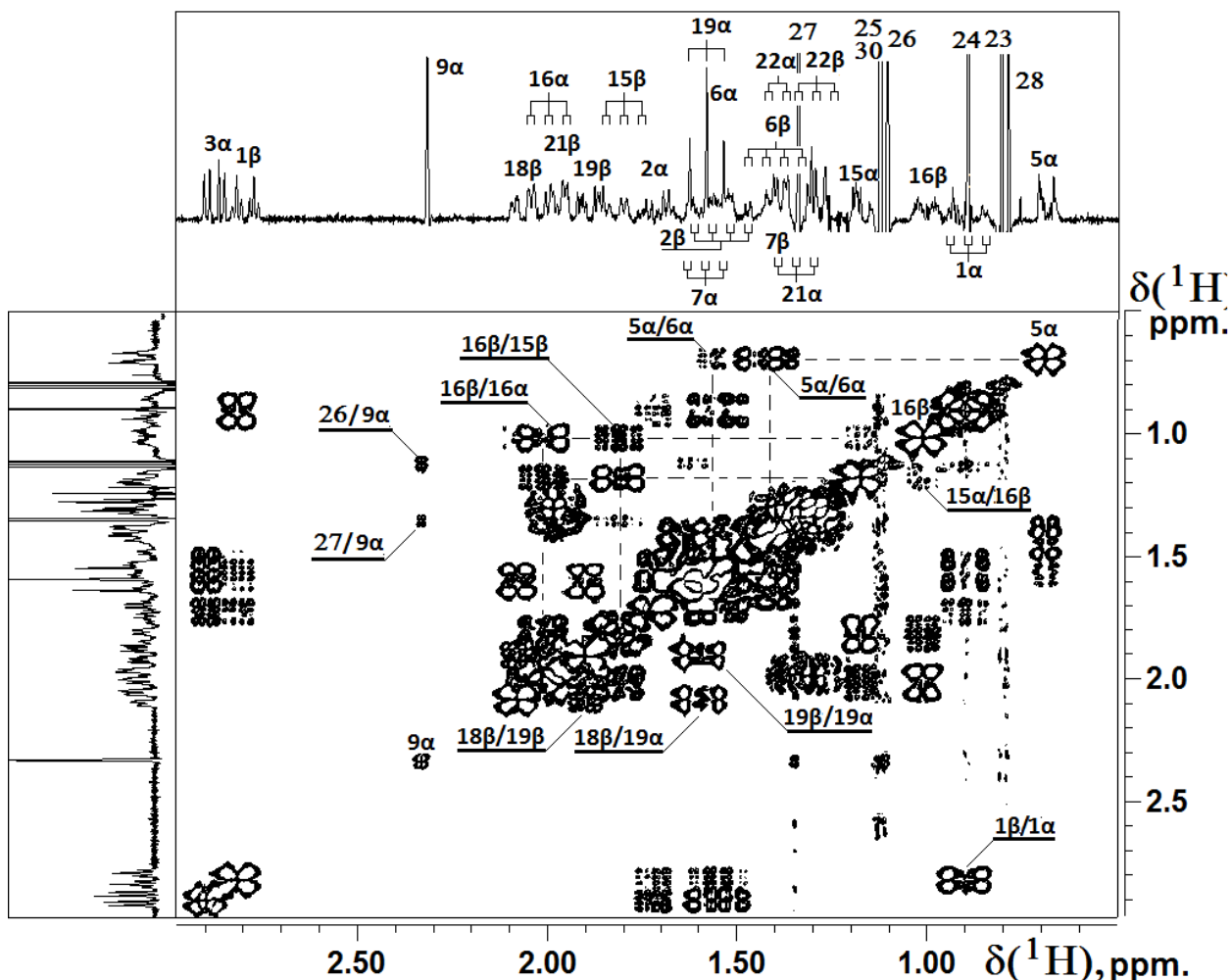


Рис. 12 Фрагмент алифатической области спектров DQF-COSY и ЯМР 1H тритерпеноида (**1a**). Показано расположение некоторых кросс-пиков и всех сигналов, мультиплетная структура которых указана на одномерном протонном спектре.

При анализе спектра DQF-COSY, прежде всего, нужно обратить внимание на два кросс-пика 26/9α и 27/9α, которые свидетельствуют о дальних скалярных взаимодействиях протона 9α с метильными группами Me26 и Me27. Если первое из них является вполне ожидаемым и соответствует хорошо известному “W”-типу скалярной связи между *транс*-ориентированными между собой протоном 9α, находящимся в α-области молекулы (**1a**), и группой Me26, расположенной в ее β-области, то скалярное взаимодействие 27/9α через 5 ковалентных связей между протоном 9α и протонами метильной группы Me27, находящимися в α-области этого

тритерпеноида, является противоречащим правилу W-расположения фрагмента $H^{9\alpha}-C^9-C^8-C^{14}-C^{27}-H_3$. Следовательно, ответственным на наличие константы $^5J_{Me27-9\alpha}$ могут быть пространственные взаимодействия между указанными протонами, либо реализуется механизм скалярного взаимодействия с участием не только σ -орбиталей указанной системы связей, но и π -орбиталей двойной связи $C^{12}=C^{13}$.

Поскольку доказанных примеров таких пространственных скалярных взаимодействий невелико, то его обнаружение в данной работе обладает самостоятельной ценностью и имеет как теоретический, так и практический интерес. Однако изучение вопроса о механизме данного взаимодействия выходит за рамки настоящего исследования, поскольку требует дополнительных усилий и времени. Но к нему следует обязательно вернуться в ближайшем будущем.

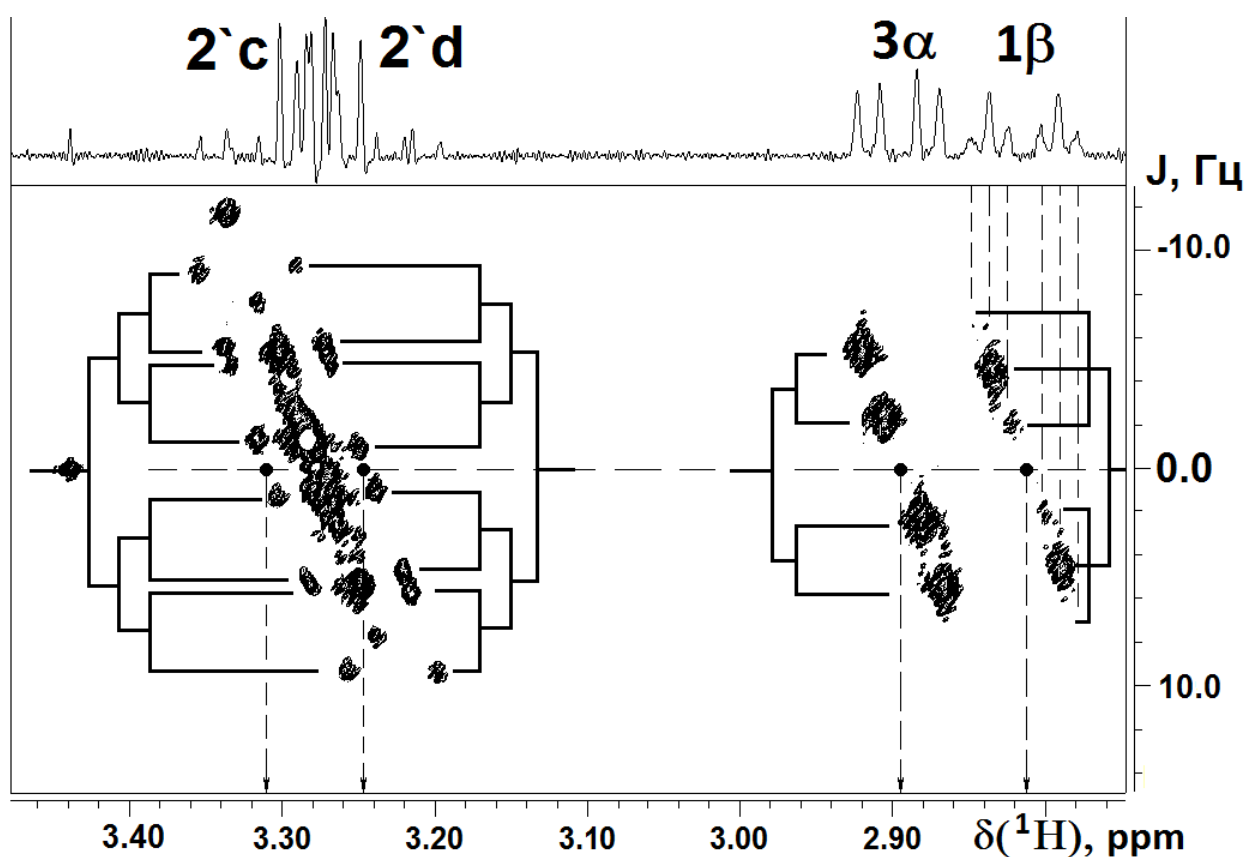


Рис. 13 Фрагмент алифатической области спектров J-COSY и ЯМР 1H тритерпеноида (**1a**). Показаны положения сигналов четырех протонов и их мультиплетная структура

При получении и анализе спектра J-COSY соединения (**1a**), также как и в случаях использования этого метода для других тритерпеноидов, обнаружена одна характерная для этих соединений особенность, заключающаяся в значительном снижении его информативности из-за заметного размывания контура сигналов в этом двумерном спектре. Причем, это утверждение относится исключительно к сигналам

протонов, принадлежащим кольцам А–Е, в то время как сигналы протонов боковых заместителей имеют более узкие линии в спектре ЯМР ^1H и их контуры хорошо видны в двумерном представлении спектра J-COSY. В качестве примера данной особенности на **Рис. 13** показан фрагмент спектра J-COSY тритерпеноида (**1a**) в области 2.8 – 3.4 м.д., где находятся 2 сигнала протонов 1β и 3α (кольцо А) и два сигнала $2'\text{c}$ и $2'\text{d}$ геминальных протонов в положении $2'$ тетразолилэтоксигруппы бокового заместителя в положении 3β . Даже в протонном спектре, который приведен в верхней части **Рис. 13**, хорошо видно, что полуширина ($\Delta\nu_{1/2}$) сигналов протонов, находящихся в более подвижной части молекулы (**1a**), заметно меньше, чем для протонов 1β и 3α , подвижность которых определяется только общим диффузионным движением этой молекулы. Следовательно, единственным существенным различием сравниваемых пар протонов является степень усреднения прямых диполь-дипольных взаимодействий и, соответственно, уровень выполнения требования экстремального сужения линий в спектре ЯМР: $\omega_0\tau_c \ll 1$.

Таким образом, для изучаемых тритерпеноидов в спектрах J-COSY, полученных на частоте 300 МГц, обнаруживается экспериментальное подтверждение уменьшения времени поперечной (спин-спиновой) релаксации T_2 для менее подвижных протонов, находящихся в наиболее жесткой части углеродного скелета. В свою очередь уменьшение времени T_2 приводит к сокращению времени жизни первоначального фазово-упорядоченного состояния и к ускоренному затуханию сигнала спинового эха, на котором основан метод J-COSY. В результате этого в спектральном представлении для протонов 1β и 3α происходит размывание сигналов и даже исчезновение отдельных компонент их мультиплетных сигналов. Последнее особенно хорошо заметно на сигнале экваториального протона 1β при 2.82 м.д., который имеет структуру дублета триплетов, но в спектре J-COSY внешние компоненты триплетов практически отсутствуют. Аналогичная картина наблюдается и в области 0.7 – 2.2 м.д., где находятся мультиплетные перекрывающиеся между собой сигналы всех остальных протонов колец А – Е. Таким образом, следует указать на снижение эффективности использования метода J-COSY для тритерпеноидных молекул с молекулярным весом более 450 Da по сравнению, например, со стероидами ($M \sim 350$ Da), и необходимость использования любых возможностей для устранения (или снижения) этого негативного фактора с помощью повышения температуры,

уменьшения концентрации и использования менее вязких растворителей или даже более низкочастотных спектрометров ЯМР.

Полученные результаты идентификации протонных сигналов в спектре ^1H тритерпеноида (**1a**) и измерения скалярных констант $^2\text{-}^4J_{\text{H-H}}$ представлены в **таблице 1**, в которой также указано положение (ax - аксиальное, eq – экваториальное) и пространственная α - или β -ориентация этих протонов. В этой же таблице приведены значения химических сдвигов всех атомов углерода- ^{13}C , которые были установлены на основании положений сигналов в спектре ЯМР ^1H и корреляций между ядрами ^1H и ^{13}C через прямые и дальние гетероядерные взаимодействия с помощью методов HSQCnd2 и COLOC, соответственно (см. эти спектры в приложениях П2-6 и П2-7).

Следует отметить, что наиболее сложными для отнесения оказались протоны спиновых систем кольца В ($\text{C}^5\text{H}-\text{C}^6\text{H}_2-\text{C}^7\text{H}_2$), которую можно охарактеризовать как пяти-спиновую систему типа ABCDX, и кольца Е ($\text{C}^{21}\text{H}_2-\text{C}^{22}\text{H}_2$), которую аналогичным образом можно описать как четырех-спиновую систему типа ABCX. В этих сильносвязанных спиновых системах роль протона X играют, соответственно, протоны 5α и 21β . Поэтому определение скалярных констант в этих спиновых системах из-за эффектов сильносвязанности является крайне затруднительным и в **таблице 1** они отсутствуют.

При идентификации сигналов в спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C тритерпеноида (**1b**) использовался аналогичный подход, как и для тритерпеноида (**1a**). Лишь небольшие различия химических сдвигов для этих соединений позволяют сделать вывод об идентичности углеродных скелетов этих молекул. Тем не менее, следует еще раз указать на преимущество параллельного спектрального изучения близких молекул, поскольку наблюдаемые едва заметные различия в положениях сигналов дает возможность подтвердить (или опровергнуть) какое либо предположение, полученное на основании изучения корреляционных спектров только одного из них.

Результаты исследования протонных и углеродных спектров ЯМР соединения (**1b**) приведено в **таблице 1**, а корреляционные спектры представлены в приложениях П2-1 – П2-13.

Таблица 1

Спектральные характеристики $\delta(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ и $^{2-4}\text{J}_{\text{H-H}}$ тритерпеноидов **(1a)** и **(16)**
 CDCl_3 , 20 °C

№	δ_{C} , м. д.		δ_{H} , м. д. (мультиплетность)		$^{2-4}\text{J}_{\text{H-H}}$, Гц	Положение и ориентация протона	
	(1a)	(16)					
			(1a) ^{d)}	(16) ^{c)}			
1	38.68	38.68	0.90 (ддд) 2.82 (ддд)	0.88 2.81	(13.6, 13.4, 3.8) (13.6, 3.6, 3.6)	ax eq	α β
2	22.73	22.52	1.54 (дддд) 1.72 (дддд)	1.56 1.69	(13.7, 13.4, 11.7, 3.6) (13.7, 4.5, 3.8, 3.6)	ax eq	β α
3	87.56	87.25	2.90 (дд)	2.86	(11.7, 4.5)	ax	α
4	38.84	38.95	-	-			
5	55.13	55.19	0.68 (дд)	0.68	(11.8, 2.3)	ax	α
6	17.25	17.23	1.42 (дддд) 1.57 (дддд)	1.42 1.58	(11.8, 12.8, 12.8, 3.9) (12.8, 2.3) ^{a)}	ax eq	β α
7	32.55	32.57	1.64 (ддд) 1.39 (ддд)	1.64 1.39	(12.8, 12.8) ^{a)} (12.8, 3.9) ^{a)}	ax eq	α β
8	45.36	45.25	-	-			
9	61.64	61.64	2.33 (с)	2.31		ax (B) ^{e)}	α
10	36.88	36.82		-			
11	200.61	200.05	-	-			
12	128.20	128.36	5.69 (с)	5.64			
13	170.13	170.12	-	-			
14	43.14	43.02	-	-			
15	26.34	26.31	1.82 (ддд) 1.17 (ддд)	1.81 1.18	(13.8, 13.8, 3.8) (13.8, 3.8, 2.4)	ax eq	β α
16	26.24	26.24	1.01 (дддд) 2.01(ддд)	0.99 2.02	(13.6, 3.8, 2.4, 1.7) (13.6, 13.8, 3.8)	eq ax	β α
17	31.71	31.67	-	-			
18	48.31	48.22	2.08 (дддд)	2.06	(13.5, 4.4, 1.7, \approx 0.8)	eq (E) ^{e)}	β
19	40.98	40.94	1.57 (дд) 1.90 (ддд)	1.59 1.90	(13.7, 13.5) (13.7, 4.4, 2.7)	ax eq	α β
20	43.92	43.88	-	-			
21	30.99	30.96	1.31 (ддд) 1.99 (дддд)	1.31 2.00	(13.0, 13.8) ^{b)} (13.8, 2.7) ^{b)}	ax eq	α β
22	37.58	37.58	1.29 (ддд) 1.39 (ддд)	1.29 1.39	(13.0) ^{b)}	ax eq	β α
23	28.12	28.03	0.81 (3H, с)	0.78			α
24	16.58	16.16	0.90 (3H, с)	1.00			β
25	16.23	16.21	1.13 (3H, с)	1.13			β
26	18.57	18.53	1.11 (3H, с)	1.10			β
27	23.21	23.22	1.34 (3H, с)	1.34			α
28	28.41	28.37	0.79 (3H, с)	0.79			β

29	28.19	28.17	1.13 (3H, c)	1.12			α
30	176.83	176.75	-	-			
1'	65.80	63.82	3.97 (ддд) 3.67 (ддд)	3.82 3.50	(5.3, 7.0, 9.3) (5.8, 7.0, 9.3)	(6.0, 6.0, 9.3) (6.4, 7.0, 9.3)	a b
2'	24.79	19.11	3.31 (ддд) 3.25 (ддд)	2.58 2.54	(5.1, 6.0, 15.8) (5.1, 6.0, 15.8)	(5.9, 7.1, 16.8) (6.0, 6.0, 16.8)	c d
3'	154.25	118.07	-	-			
1''	51.72	51.67	3.69 (3H, c)	3.67			

- a) – Константы получены с использованием спектров HSQCnd; остальные значения констант не могут быть точно определены из-за сильносвязанности протонов этанового фрагмента $C^6H_2-C^7H_2$;
- b) – Константы получены с использованием спектров HSQCnd; остальные значения констант не могут быть точно определены из-за сильносвязанности протонов этанового фрагмента $C^{21}H_2-C^{22}H_2$;
- c) – мультиплетность сигналов и значения констант совпадает с данными для тритерпеноида (**1a**);
- d) – обозначение мультиплетности: d – дублет, dd – дублет дублетов, ddd – дублет дублета дублетов, dddd – дублет дублета дублета дублетов.
- e) – в скобках указано по отношению к какому кольцу протон является аксиальным или экваториальным

Идентификация протонных сигналов в спектрах тритерпеноидов (**1a**) и (**16**) в рамках данной работы не являлась самоцелью. Она была лишь необходимым условием для проверки методологии количественных оценок межпротонных расстояний и вицинальных констант $^3J_{H-H}$ и были выбраны для исследования, поскольку имеют достаточно высокий молекулярный вес и должны иметь, согласно предварительным расчетам, значительную анизотропию диффузионного движения в растворе. Влияние этих факторов на точность оценок межпротонных расстояний, а также сама возможность использования этих оценок для тритерпеноидов, будет обсуждаться в следующих разделах настоящей работы.

2.2.2 Идентификация сигналов в спектрах ЯМР 1H тритерпеноидов (**2a**) и (**26**)

В литературе практически отсутствует систематическое описание спектров ЯМР 1H тритерпеноидов, относящиеся к даммарановому ряду. Как правило, исследование в этом направлении ограничивается идентификацией синглетных сигналов метильных групп и отдельно расположенных мультиплетных сигналов некоторых протонов, которые по тем или иным структурным причинам оказались за пределами области (0.5 – 2.5 м.д.) интенсивного перекрывания большинства алифатических протонов изучаемых тритерпеноидов. К этому следует добавить, что в

тех работах, в которых в последнее время предпринимались попытки полной идентификации протонного спектра таких тритерпеноидов, использовались преимущественно высокопольные спектрометры ЯМР с рабочей частотой от 500 до 800 МГц, которые обычно используются для исследования биополимеров с молекулярным весом от 1000 Da и выше (до 60 kDa). В данной работе по указанным выше причинам использовался спектрометр на 300 МГц и очевидным следствием этого была повышенная сложность, как идентификации протонных сигналов, так и точного измерения величин скалярных констант.

Тритерпеноиды (**2a**) и (**2б**) отличаются друг от друга заместителем в положении 3 (кетогруппа для (**2a**) и α -гидроксильная группа для (**2б**)). Как и для тритерпеноидов (**1a**) и (**1б**), так и для (**2a**) и (**2б**) спектры ЯМР ^1H и ^{13}C похожими, но не абсолютно одинаковыми. Для соединения (**2a**) в области 2.35-2.55 м.д. находятся сигналы 2-х протонов. Сигналы всех остальных протонов располагаются в области 0.8-2.00 м.д. Можно утверждать, что сигналы при 2.42 и 2.47 м.д. относятся к геминальным протонам в положении 2. Это подтверждается эффектом «крыши» в спектре, что свидетельствует о сильносвязанности данных протонов по большой геминальной константе $^2J_{2\alpha-2\beta}$. Кроме того, в спектре NOESY наблюдаются пространственные взаимодействия между протоном 2α (2.42 м.д.) и протонами метильных групп Me29 (1.06 м.д.) и Me19 (0.92 м.д.). В свою очередь протон 2β (2.47 м.д.) взаимодействует через пространство (ЯЭО) с метильными группами Me28 (1.02 м.д.) и Me19 (0.92 м.д.), а в спектре COSY-90 наблюдаются скалярные взаимодействия между протонами при первом и втором атомах углерода (см. **Рис.14** и **Рис. 15**, соответственно).

При идентификации сигналов протонов кольца В ($\text{C}^5\text{H}-\text{C}^6\text{H}_2-\text{C}^7\text{H}_2$) вначале находили сигнал протона 5α . Протон 5α (1.36 м.д.) и протоны метильной группы Me28 (1.06 м.д.) взаимодействуют через пространство (ЯЭО). В спектрах COSY-90 и NOESY можно увидеть, соответственно, косвенные и прямые взаимодействия протонов 5α и 6α (1.56 м.д.), 6α и 7β (1.29 м.д.). Для полного отнесения протонов в спиновых системах колец В и С спектров COSY и NOESY оказывается недостаточно. Это связано с тем, что сигналы протонов из одной спиновой системы близко расположены между собой. Для решения данной задачи дополнительно использовались гетероядерные корреляционные методы HSQCnd и COLOC.

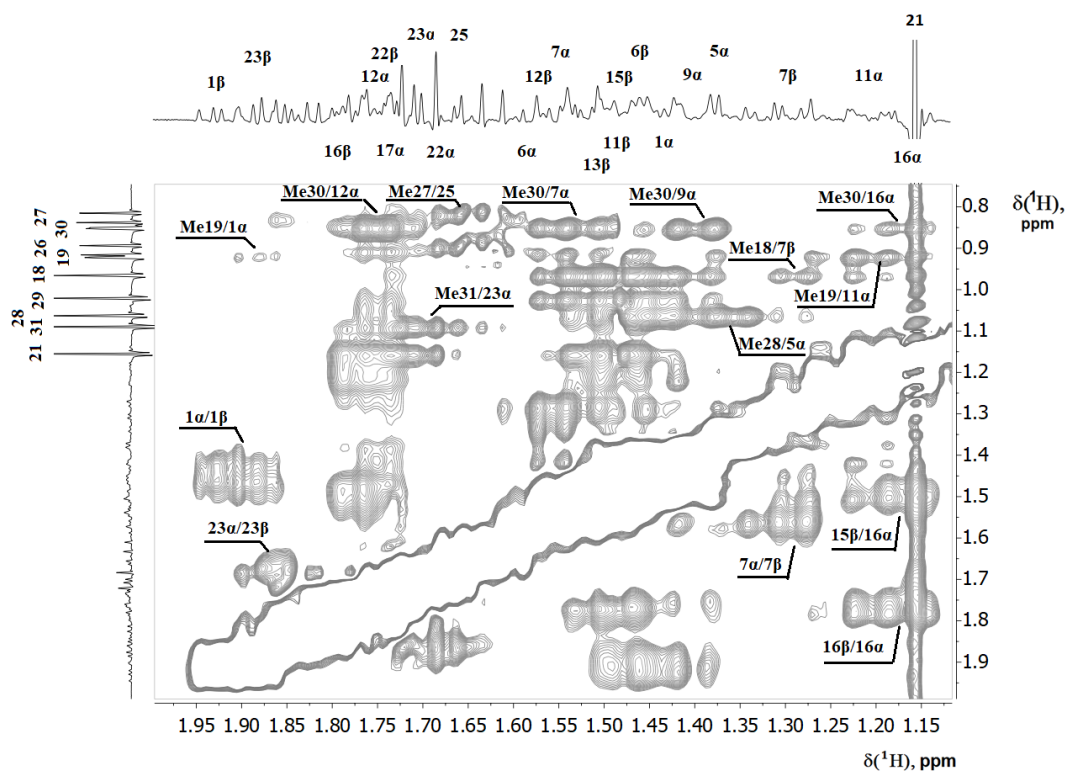


Рис. 14 Фрагмент алифатической области спектров ЯМР ^1H и NOESY ($\tau_m = 0.5$ с) соединения (**2a**).

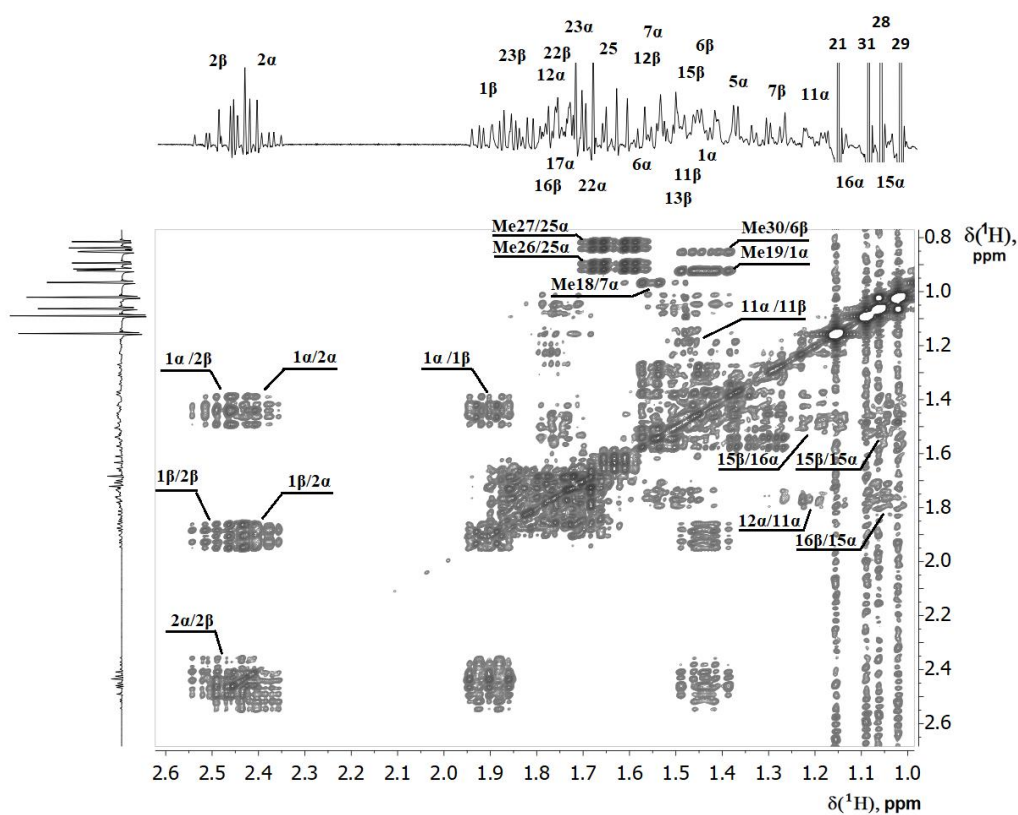


Рис. 15 Фрагмент алифатической области спектров ЯМР ^1H и COSY-90 соединения (**2a**). Показано положение всех протонных сигналов и некоторых кросс-пиков.

Так, например, для однозначного определения положения сигналов 6 β и 7 α применялся метод HSQCnd2 (см. спектр в приложении П2-20). Данный эксперимент позволяет связывать сигналы пар геминальных протонов в метиленовой группе через прямые их константы ($^1J_{C-H}$) с соответствующим атомом углерода. После определения положения сигналов 6 α и 7 β в спектре, не составляет труда установить положение сигналов протонов 6 β (1.44 м.д.) и 7 α (1.45 м.д.). Аналогичная тактика применялась и для идентификации протонных сигналов в кольце С ($C^9H-C^{11}H_2-C^{12}H_2-C^{13}H$).

Строение кольца D отличается от шестичленных колец А, В и С. В спектре ЯМР 1H сигналы протонов 15 α и 16 β расположены в области сигналов метильных групп. Поскольку почти все сигналы метильных групп данного соединения являются синглетами, то они не очень сильно мешают определению сигналов этих метиленовых протонов. Для протона 16 α (1.18 м.д.) наблюдаются пространственные взаимодействия с протонами 16 β (1.78 м.д.), 15 β (1.46 м.д.) и метильной группы Me30 (0.85 м.д.), а протон 15 α (1.05 м.д.) взаимодействует через пространство с протонами 16 β , 15 β и Me30. Кроме того, в спектре COSY-90 наблюдаются скалярные взаимодействия протона 15 α с протонами 15 β , 16 β и протона 16 α с протонами 16 β и 15 β .

Кольцо Е содержит изопропильный заместитель. Поэтому не сложно определить, что дублеты при 0.83 м.д. и 0.91 м.д. с константой $^3J_{H-H} = 7$ Гц являются сигналами метильных групп Me26 и Me27, а для сигнала протона 25 при 1.66 м.д. в спектре COSY-90 наблюдаются соответствующие кросс-пики с этими дублетными сигналами.

Процедура отнесения протонных сигналов для тритерпеноида (26) лишь незначительно отличается от анализа спектра соединения (2a). Например, сигнал при 3.39 м.д можно отнести протону 3 β на том основании, что этот протон имеет скалярные взаимодействия с протонами 2 α (1.94 м.д.) и 2 β (1.53 м.д.), а протон 3 β взаимодействует через пространство с протонами 2 α , 2 β , а также с протонами метильных групп Me19 (0.85 м.д.) и Me28 (0.94 м.д.). Кроме того, в спектре DQF-COSY наблюдаются скалярные взаимодействия между протоном 2 α и протонами 1 α (1.42 м.д.) и 1 β (1.26 м.д.), а также между протоном 2 β и протонами 1 α и 1 β .

При идентификации всех остальных сигналов в спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C тритерпеноида (**26**) использовался аналогичный подход, как и для тритерпеноида (**2a**). Результаты идентификации сигналов ядер ^1H и ^{13}C тритерпеноидов (**2a**) и (**26**) приведены в таблице 2.

Таблица 2

Химические сдвиги $\delta(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ тритерпеноидов (**2a**) и (**26**) в CDCl_3 и тритерпеноида (**3**) в $\text{CD}_3\text{OD}^{***}$ при 20 °C.

№ атома C	δ_{C} , м. д.			δ_{H} , м. д.			Положение и ориентация протона	
	(2a)	(26)	(3)	(2a)	(26)	(3)		
1	40.75	34.53	53.57	1.43 1.90	1.42 1.26	1.58 2.17	- -	α β
2	34.96	26.26	43.68	2.42 2.47	1.94 1.53	-	- -	α β
3	219.02	77.20	221.36	-	3.39	-	-	β
4	48.26	38.15	47.23	-	-	-	-	-
5	56.16	51.35	52.67	1.36	1.42	1.91	ax (B)**)	α
6	20.51	19.13	21.36	1.56 1.44	1.40 1.41	1.75 1.66	eq ax	α β
7	35.44	36.08	35.08	1.29 1.54	1.25 1.59	1.32 1.63	eq ax	β α
8	41.06	41.43	41.44	-	-	-	-	-
9	50.85	50.44	49.90	1.40	1.23	1.78	ax (B)**)	α
10	37.67	38.52	38.02	-	-	-	-	-
11	22.83	22.21	23.41	1.20 1.48	1.19 1.50	1.37 1.63	eq ax	α β
12	26.36	26.38	25.78	1.75 1.55	1.75 1.55	~1.63 (2H)	ax eq	α β
13	44.09	43.99	43.68	1.50	1.46	1.51	ax (C)**)	β
14	50.85	51.02	51.27	-	-	-	-	-
15	31.86	31.87	32.29	1.46 1.05	1.42 1.03	1.10 1.51	- -	β α
16	27.57	27.70	28.89	1.78 1.18	1.73 1.17	1.34 1.92	- -	β α
17	51.18	51.30	51.28	1.73	1.72	1.60	ax	α
18	16.06	16.42	15.22	0.96 (3H)	0.94 (3H)*)	1.04	ax	β
19	16.89	16.90	18.42	0.92 (3H)*)	0.85 (3H)*)	0.84	ax	β
20	86.56	86.66	76.03	-	-	-	-	-
21	25.89	25.78	25.32	1.16 (3H)	1.16 (3H)	1.14	-	-
22	37.99	38.15	42.42	1.67 1.74	1.68 1.74	~1.73 (2H)	- -	α β
23	36.88	36.91	23.64	1.68 1.84	1.67 1.85	~2.03 (2H)	- -	α β
24	86.04	86.03	126.00	-	-	5.10	-	-
25	38.85	38.89	131.98	1.66	1.65	-	-	-
26	18.44	18.48	25.95	0.90 (3H)	0.91 (3H)	1.67 (3H)*)	-	цис-

27	19.61	19.63	17.78	0.83 (3H)	0.83 (3H)	1.62 (3H) ^{*)}	-	<i>транс</i> -
28	27.66	29.20	30.58	1.06 (3H)	0.94 (3H)	1.20 (3H)	-	α
29	21.86	23.01	23.71	1.02 (3H)	0.83 (3H)	1.13 (3H)	-	β
30	17.09	17.32	16.92	0,85 (3H) ^{*)}	0,87 (3H) ^{*)}	0.96 (3H)	ax	α
31	23.82	23.86		1.09 (3H)	1.10 (3H)		-	-
1'			40.08			2.15 2.34	- -	a' b'
2'			19.39			2.59 2.94	- -	c' d'
3'			157.44			-	-	-
1''			35.81			~2.03 (2H)	- -	a'' b''
2''			19.39			2.91 (2H)	- -	c'' d''
3''			158.17			-	-	-

*) - дублет с константой $^4J \approx 1.0$ Гц

**) – в скобках указано кольцо, по отношению к которому дана аксиальная ориентация мостикового протона;

***) – измерено в CD₃OD (3.31 м.д. для CHD₂OD и 49.05 м.д. для CD₃OD).

2.2.3 Идентификация сигналов в спектрах ЯМР ¹H тритерпеноида (3)

Тритерпеноид (3) отличается от соединений (2) структурой заместителей в положениях 2 и 17. Поэтому ограничимся лишь описанием спектра ЯМР ¹H этих заместителей, который "накладывается" на спектр протонов, находящихся в различных положениях углеродного скелета колец А – D. Прежде всего, следует отметить, что тритерпеноид (3), в отличие от других исследованных в работе соединений, очень плохо растворялся в CDCl₃ и поэтому он исследовался в CD₃OD.

Наиболее просто сделать отнесения сигналов заместителя в положении 17 β . Совершенно очевидно, что мультиплетный сигнал при 5.10 м.д., который может быть определен как триплет квартета квартетов, принадлежит протону 24 (Рис. 16). Триплетное расщепление с константой $^3J_{H-H} = 7.2$ Гц принадлежит скалярному взаимодействию с метиленовыми протонами в положении 23 (~2.3 м.д.), а два квартетных расщепления с константами 1.6 и 1.2 Гц, соответствуют взаимодействиям с *транс*- и *цис*-расположенными метильными группами 27 и 26, соответственно. Поэтому сигналы последних легко обнаруживаются при 1.62 и 1.67 м.д., благодаря соответствующим дублетным расщеплениям в спектрах ¹H и J-COSY или кросс-пикам в спектре DQF-COSY (см. спектры в приложениях П2-29 – П2-33). Не менее важным аргументом доказательства отнесения метиленовых протонов в положениях

23 и 22 является наличие ЯЭО между ними, а также с протоном 24 и *транс*-метильной группой Me27.

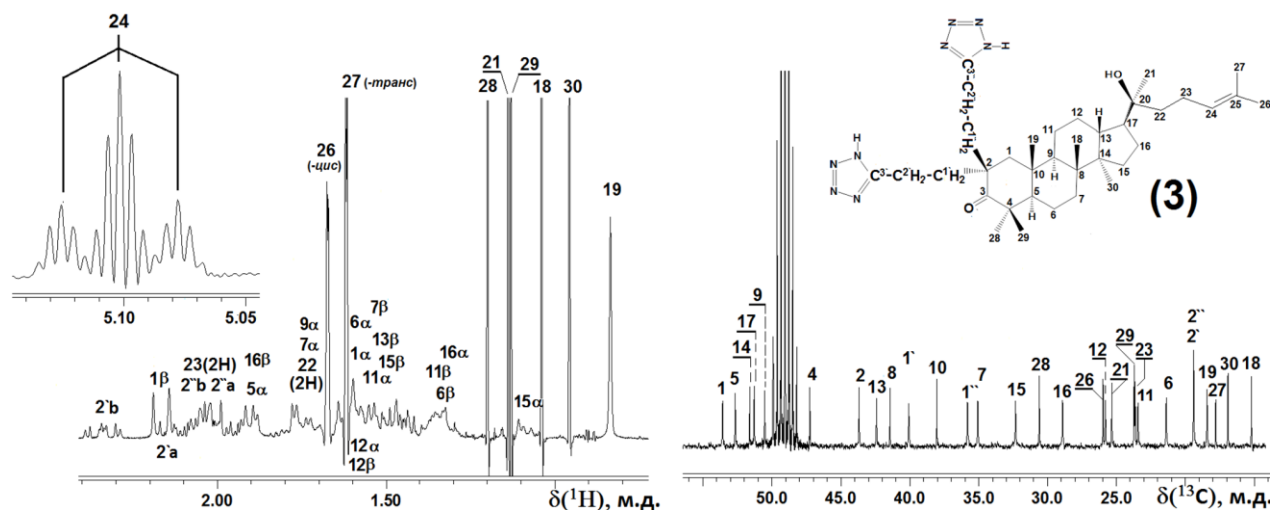


Рис. 16 Фрагменты алифатических областей спектров ЯМР ^1H и ^{13}C тритерпеноида (3).

Все остальные сигналы протонов колец А – D были идентифицированы аналогичным образом как это описано выше для похожих тритерпеноидов (2а) и (2б). Результаты полной идентификации протонных и углеродных сигналов в соответствующих спектрах тритерпеноида (3) приведены в **таблице 2**.

Идентификация сигналов протонов этановых фрагментов $\text{C}^1\text{H}_2\text{--C}^2\text{H}_2$ и $\text{C}^{1''}\text{H}_2\text{--C}^{2''}\text{H}_2$ оказывается еще проще, поскольку они занимают достаточно удобную высокочастотную часть алифатической области спектра ЯМР ^1H и наблюдается лишь частичное перекрывание протона 2'с с дублетным сигналом протона 1β, а сигналов протонов 2''с и 2''d с сигналами метиленовых протонов в положении 23.

2.3 Использование количественных оценок ЯЭО и вицинальных констант $^3J_{\text{H--H}}$ для доказательства конформационной жесткости углеродного скелета тритерпеноида (1а)

Полученные в разделе 2.2.1 отнесения сигналов в спектре ЯМР ^1H тритерпеноида (1а) позволили с помощью метода NOESY идентифицировать более 30-ти пространственных взаимодействий и среди них выбрать семнадцать наиболее удобных для количественного интегрирования кросс- и диагональных пиков с целью количественных оценок соответствующих межпротонных расстояний [3]. Кроме того, с помощью методов DQF-COSY, J-COSY и селективной развязки $^1\text{H}\{^1\text{H}\}$ были определены точные значения вицинальных констант $^3J_{\text{H--H}}$ с целью их сопоставления с соответствующими расчетными значениями, полученными на основе оптимизации

геометрии молекулы (**1a**) методом молекулярной механики MM2 и использования Карплусовской зависимости, предложенной в работе [41].

Основной целью такого количественного сопоставления экспериментальных и расчетных значений межпротонных расстояний и вицинальных констант являлось получение экспериментальных доказательств конформационной жесткости (или конформационной мобильности) исследуемой молекулы. Одновременно, результаты этой части работы могли дать ответ на вопрос о корректности использования количественных оценок расстояний для тритерпеноидных молекул, молекулярный вес которых превышает 450 Da, и имеется вполне реальная возможность попадания на нелинейный участок зависимости вероятностей двухквантовых (W_2) и нульквантовых (W_0) переходов от параметра $\omega_0\tau_c$ (см **Рис. 4**), что означало бы невозможность корректного использования калибровочного метода измерения неизвестного расстояния путем линейного сопоставления скорости его кросс-релаксации с данными для известного эталонного расстояния. Эти и другие вопросы подробно рассмотрены в следующих двух разделах.

2.3.1 Применение калибровочного метода измерения скоростей кросс-релаксации B_{H-H} с помощью ЯЭО для тритерпеноида (1a**) с учетом анизотропии диффузии, включая экспериментальную оценку параметра анизотропии D_{\parallel}/D_{\perp}**

Для экспериментального определения скоростей кросс-релаксации B_{H-H} были получены 8 спектров NOESY тритерпеноида (**1a**) при временах смешивания $\tau_m = 0.05; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 0.6$ и 0.8 с. Поскольку эти измерения проводились в условиях неполной релаксационной задержки (режим Fast NOESY [4]), то был использован подход *PANIC* [16,17], основанный на применении не абсолютных, а приведенных значений интегральных интенсивностей кросс-пиков: S_{ij}/S_{ii} . Результаты измерения объемных интегралов кросс- и диагональных пиков и их приведенные значения S_{ij}/S_{ii} для 17-ти расстояний даны в **таблице 3**. Для каждого из этих расстояний на основании экспериментальных значений построены зависимости $(S_{ij}/S_{ii}) = f(\tau_m)$, для которых получены линейные аппроксимации $y = A + Bx$, в которых коэффициент B соответствует экспериментальному значению скорости кросс-релаксации B_{ij} . В качестве примера некоторые графики и их линейные аппроксимации приведены в приложении **П1-1 – П1-4**.

Таблица 3

Экспериментальная зависимость приведенных значений интенсивностей кросс-пиков (S_{ij}/S_{jj}) в спектрах NOESY тритерпеноида (**1a**) от времени смешивания τ_m : $S_{ij}/S_{ii} = f(\tau_m)$

№ *)	τ_m , с	$S(H_i-H_j)/S_{ii}$							
		12-18 β /12	12-19 β /12	12-9 α /12	9 α -1 α /9 α	9 α -5 α /9 α **)	5 α -9 α /5 α **)	5 α -3 α /5 α **)	3 α -5 α /3 α **)
1 (7)	0.05	0.82	0.21	0.07	1.02	0.43	0.55	0.30	0.63
2 (6)	0.1	1.59	0.41	0.12	1.45	1.08	1.0	0.53	1.04
3 (2) ***)	0.2	3.16	0.55	0.17	2.17	1.42	1.48	0.57	1.62
(10) ***)	0.2	2.99	0.69	0.23	3.15	1.92	2.21	1.41	1.67
4 (3)	0.3	4.79	0.8	0.2	2.86	2.14	2.81	1.12	2.0
5 (4)	0.4	6.14	0.85	0.22	2.36	2.77	2.04	0.59	1.59
6 (5)	0.5	7.35	1.01	0.21	-	3.40	2.98	0.82	2.87
7 (9)	0.6	8.24	1.36	0.34	4.5	4.8	5.39	2.74	4.6
8 (11)	0.8	10.53	1.39	0.39	5.28	5.93	6.18	2.49	7.1

Таблица 3 (продолжение)

№ *)	τ_m , с	$S(H_i-H_j)/S_{ii}$							
		2 α -3 α /2 α	1 β -1 α /1 β	1 β -2 β /1 β	1 β -2 α /1 β	16 β -16 α /16 β	16 β -15 β /16 β	19 β -19 α /19 β *)	9 α -7 α /9 α
1 (7)	0.05	0.2	1.74	0.33	0.58	1.3	0.59	1.38	0.29
2 (6)	0.1	0.48	2.59	0.75	1.01	3.1	1.25	1.58	0.3
3 (2) ***)	0.2	0.44	5.12	1.59	1.30	6.5	2.1	3.3	0.39
(10) ***)	0.2	0.72	6.34	1.61	1.37	5.7	1.9	4.58	0.48
4 (3)	0.3	0.69	7.7	2.27	2.17	8.6	2.9	7.1	0.83
5 (4)	0.4	0.43	6.47	2.27	1.94	10.5	3.3	8.66	0.69
6 (5)	0.5	0.36	8.05	3.03	2.67	10.2	3.9	10.2	1.04
7 (9)	0.6	1.34	13.4	3.53	3.73	11.5	3.9	11.7	0.8
8 (11)	0.8	1.49	16.78	3.97	2.76	12.5	4.3	13.7	1.0

Таблица 3 (продолжение)

№ *)	τ_m , с	$S(H_i-H_j)/S_{ii}$		
		3 α -1 α /3 α	3 α -1 β /3 α	2 α -1 α /2 α
1 (7)	0.05	0.43	0.77	0.13
2 (6)	0.1	0.55	1.05	0.33
3 (2) ***)	0.2	0.53	1.65	0.3
(10) ***)	0.2	0.95	1.84	0.64
4 (3)	0.3	0.76	1.73	0.39
5 (4)	0.4	0.86	2.13	0.32
6 (5)	0.5	0.86	2.54	0.16
7 (9)	0.6	1.9	4.1	1.3
8 (11)	0.8	2.05	4.4	1.46

*) – в скобках указаны номера соответствующего спектра NOESY;

**) – использовались оба кросс-пика и определялось средне-арифметическое значения B_{HH} ;

***)) – сделаны два одинаковых эксперимента для проверки воспроизводимости результатов.

Результаты оценок скоростей кросс-релаксации B_{ij} , полученные с помощью этих процедур, включая коэффициент Пирсона (r), среднеквадратичное отклонение (sd) и постоянный член линейной зависимости (A), приведены в **таблице 4**.

Таблица 4

Результаты определения скорости кросс релаксации B_{H-H} с помощью зависимости $S_{ij}/S_{ii} = f(\tau_m)$ и линейной аппроксимации $Y = A + BX$

№	H_i-H_j	σ, c^{-1}	r	sd	A	$r^{расч.}, \text{\AA}$ (MM2)	$r^{эксп.}, \text{\AA}$ $\text{\AA}^{**})$	$\beta, ^{***})$ град	k^β	$r^\beta, \text{\AA}$	$****)$
1	12-18 β	12.6	0.978	0.85	-0.84 \pm 0.5	2.28	1.86	32	1.08	2.00	●
2	12-19 β	1.53	0.989	0.14	0.2 \pm 0.1	2.74	2.64	65	1.0	2.64	○
3	12-9 α	0.35	0.942	0.12	-0.02 \pm 0.1	3.89	3.38	35	1.07	3.62	●
4	9 α -1 α	5.7	0.973	0.42	0.8 \pm 0.3	2.23	2.12	38	1.05	2.23	●
5	9 α -5 $\alpha^{*)}$	7.5	0.966	0.35	0.6 \pm 0.2	2.39	2.03	26	1.12	2.27	●
6	3 α -5 $\alpha^{*)}$	7.7	0.954	0.36	0.2 \pm 0.2	2.47	2.02	35	1.07	2.50	●
7	2 α -3 α	1.73	0.981	0.21	0.2 \pm 0.1	2.47	2.59	80	1.0	2.59	○
8	1 β -1 α	20.3	0.981	1.2	1.0 \pm 1.7	1.78	1.72	82	1.0	1.72	○
9	1 β -2 β	5.2	0.979	0.25	0.3 \pm 0.2	2.49	2.16	20	1.15	2.48	●
10	1 β -2 α	4.7	0.976	0.18	0.4 \pm 0.1	2.42	2.19	18	1.16	2.54	●
11	16 α -16 β	23.6	0.992	0.63	-0.65 \pm 0.4	1.77	1.68	84	1.0	1.68	○
12	16 β -15 β	7.4	0.971	0.35	-0.2 \pm 0.2	2.39	2.03	30	1.09	2.21	●
13	19 β -19 α	17.8	0.991	0.8	1.3 \pm 0.5	1.76 $^{***})$	1.76	85	1.0	1.76	○
14	9 α -7 α	1.03	0.946	0.09	0.24 \pm 0.04	2.73	2.83	82	1.0	2.83	○
15	3 α -1`a	2.5	0.984	0.16	0.08 \pm 0.1	2.78	2.44	48	1.03	2.51	Δ
16	3 α -1`b	4.8	0.991	0.3	0.4 \pm 0.2	2.28	2.19	22	1.13	2.47	Δ
17	2 α -1`a	1.8	0.971	0.13	0.2 \pm 0.1	2.20	2.58	14	1.17	3.02	Δ

$^{*)}$ – соответствует среднеарифметическому значению B , полученному из анализа двух кросс-пиков;

$^{**})$ – значения получены калибровочным методом ($r^{эт.} = 1.76 \text{ \AA}$) с использованием изотропной (сферической) модели, для которой $\tau_c^{эт.} = \tau_c^{неизв.}$;

$^{***})$ – полярный угол для неизвестного расстояния $r^{неизв.}$, полученный в результате оптимизации геометрии молекулы методом MM2;

$^{****})$ ○, ● и Δ – обозначение точек на корреляционных графиках “а” и “б” (**Рис. 17**).

В качестве эталонного расстояния использовалось значение 1.76 \AA для расстояния между геминальными протонами 19 α и 19 β , которое было получено в результате оптимизации пространственного строения тритерпеноида (**1a**) методом MM2. Значения расчетных ($r^{расч.}$, MM2) и экспериментальных ($r^{эксп.}$ ЯМР) расстояний приведены в **таблице 4**, а их соответствие между собой показано на **Рис. 17a**.

На этом корреляционном графике хорошо видно, что только 6 точек соответствует расхождению расчетных и экспериментальных данных в пределах менее $\pm 5\%$ (эти данные показаны открытыми кружочками – ○), а остальные 8 точек выпадают из этого интервала и для всех этих точек выполняется следующее

неравенство $r^{\text{эксп.}} < r^{\text{расч.}}$ (эти данные показаны закрытыми кружочками – ●). Необходимо отметить, что для построения этой корреляционной зависимости, использовались только расстояния между протонами, принадлежащих кольцам А–Е. Данные для пространственных взаимодействий с участием метиленовых протонов 1'а и 1'б бокового заместителя в положении 3β показаны на корреляционных графиках (Рис. 17) с помощью открытых треугольников: Δ.

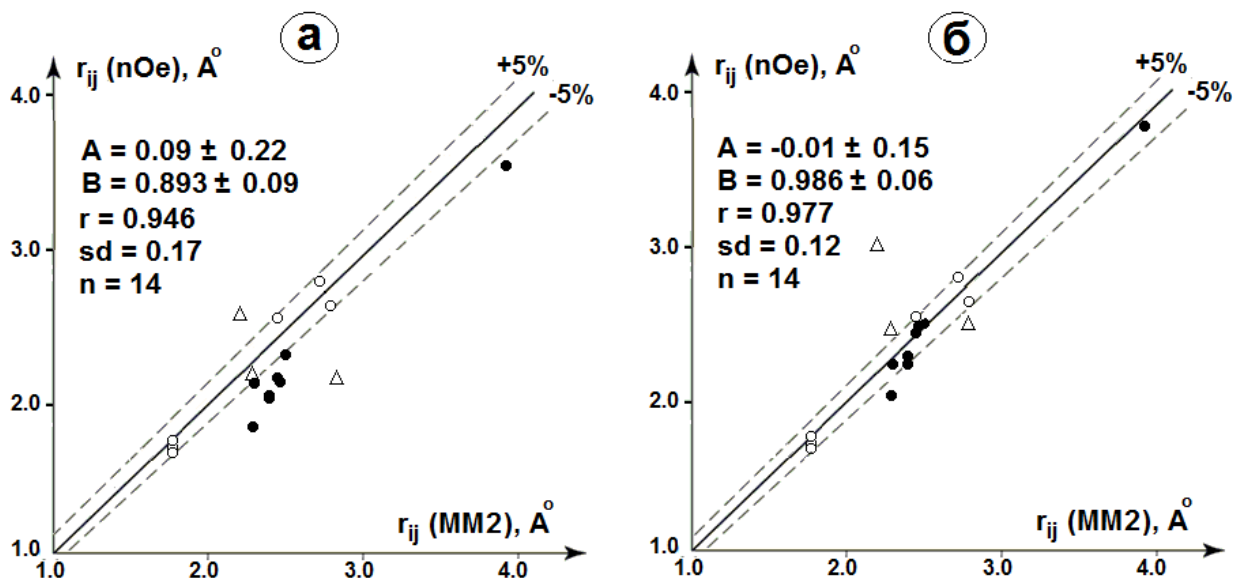


Рис. 17 Корреляции между расчетными (MM2) и экспериментальными межпротонными расстояниями в тритерпеноиде (**1а**) для изотропной (**а**) и анизотропной (**б**) моделей расчета. ○, ● – Данные для 14 расстояний между протонами колец А – Е и Δ – для 3-х расстояний с участием протонов заместителя R^{3β}. Приведены параметры линейной корреляции $Y = \underline{A} + \underline{B}X$, \underline{r} (коэффициент корреляции Пирсона) и \underline{sd} (среднеквадратичное отклонение, в Å), для \underline{n} (число использованных для корреляции точек ○ и ●).

Поскольку причин для расхождения экспериментальных значений расстояний с расчетными данными может быть несколько и среди них влияние анизотропии диффузии, характерное для аксиально-симметричной тритерпеноидной молекулы (**1а**) и наличие динамического усреднения наблюдаемых ЯЭО в результате быстрых (в шкале времени ЯМР) динамических процессов, то, прежде всего, необходимо проверить влияние первого из указанных факторов.

В данном случае, поправка на анизотропию диффузии была рассчитана исходя не из расчетного значения параметра анизотропии $(D_{\parallel}/D_{\perp})^{\text{расч.}}$, который для тритерпеноида (**1а**), составляет около 7.5 – 8.0, а из его экспериментально определенной величины $(D_{\parallel}/D_{\perp})^{\text{эксп.}}$. Она была получена на основании сопоставления гетероядерных ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$) эффектов Оверхаузера в метиленовой группе C^{21}H_2 , которая расположена в этой молекуле так, что радиус-вектор связи $\text{H}^{\text{eq}}\text{-C}^{21}$ ориентирован

вдоль главной оси “с” молекулы (**1a**), а радиус-вектор $\text{H}^{\text{ax}}\text{-C}^{21}$ практически ортогонален ей. Это показано на **Рис. 18**, где для сравнения приводится также ориентация относительно главной оси “с” метиленовой группы C^7H_2 , которая расположена так, что связи $\text{H}^{\text{eq}}\text{-C}^7$ и $\text{H}^{\text{ax}}\text{-C}^7$ имеют меньшее различие полярных углов, чем в метиленовой группе C^{21}H_2 (**Рис. 18г**).

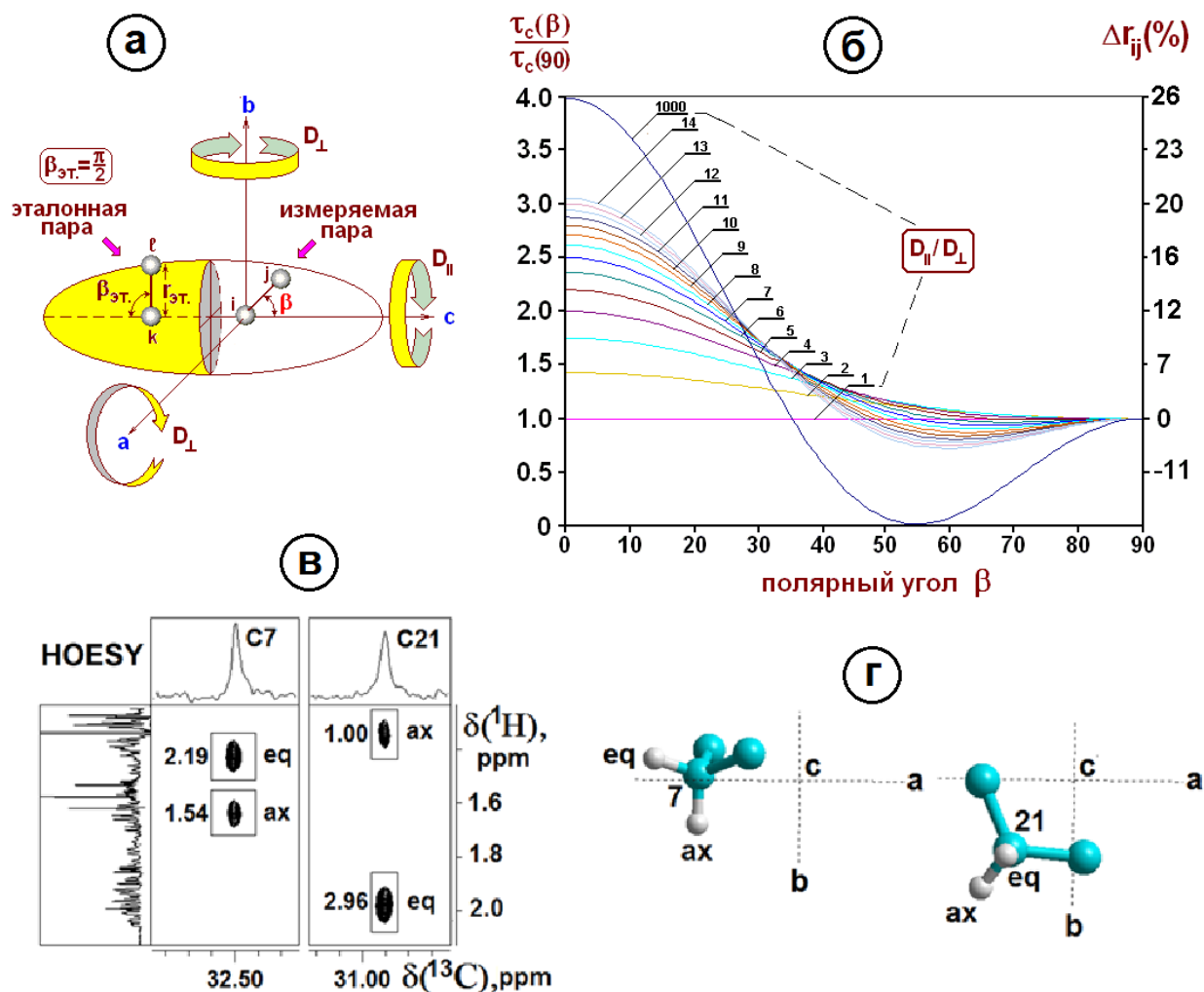


Рис. 18 Экспериментальное определение для тритерпеноида (**1a**) параметра анизотропии диффузии D_{\parallel}/D_{\perp} (**б**) в случае аксиально-симметричной молекулы (**а**) с помощью измерения гетероядерного эффекта Оверхаузера методом HOESY (**в**) в метиленовых группах C^{21}H_2 и C^7H_2 (**г**).

В приведенных на этом же рисунке фрагментах спектра HOESY (**Рис. 18в**), полученного при времени смешивания 0.6 с, хорошо видно, что соотношение интегральных интенсивностей $S_{\text{H}^{\text{eq}}\text{-C}^{21}}/S_{\text{H}^{\text{ax}}\text{-C}^{21}} = 2.96$, а для второй метиленовой группы C^7H_2 это соотношение оказывается значительно меньше: $S_{\text{H}^{\text{eq}}\text{-C}^7}/S_{\text{H}^{\text{ax}}\text{-C}^7} = 2.19:1.54 = 1.42$.

Уравнение Восснера [43] для расчета соотношения времен корреляции τ_c пар расстояний, находящихся в аксиально-симметричной молекуле под полярным углом β

(Рис. 18а), в графическом виде приведено на Рис. 18б для параметров анизотропии D_{\parallel}/D_{\perp} в пределах от 1 до 14. Оно позволяет на основании экспериментальной величины $S_{\text{Heq-C21}}/S_{\text{Нах-C21}} = 2.96$ и предположения, что расстояния каждого из двух протонов до атома углерода одинаковы, дать следующую оценку соотношения диффузионных констант: $(D_{\parallel}/D_{\perp})^{\text{эксп.}} = 12 \pm 2$. Следует отметить, что эта экспериментальная оценка параметра анизотропии диффузии более чем в 1.5 раза превышает его расчетное значение, полученное из сопоставления моментов инерции вокруг главных осей молекулы (1а).

Таким образом, полученная величина $(D_{\parallel}/D_{\perp})^{\text{эксп.}}$ позволила рассчитать поправочные коэффициенты на анизотропию диффузии: $k^{\beta} = \tau_c^{\beta}/\tau_c^{\beta=90^{\circ}}$ и получить новый набор значений межпротонных расстояний $\{r^{\beta}\}$. Этот набор соответствует использованию анизотропной (аксиально-симметричной) модели расчета. Приведенное на Рис. 17б сопоставление расчетных (ММ2) и экспериментальных расстояний r^{β} дают значительное улучшение параметров корреляции между этими данными для 14 точек (\circ и \bullet), соответствующих только расстояниям между протонами углеродного скелета колец А – Е. Это в явном виде доказывает жесткость этой части молекулы (1а) в растворе. Одновременно с этим как для изотропной (Рис. 17а) так и для анизотропной (Рис.17б) модели расчета наблюдается значительный разброс точек, связанных с тремя расстояниями между протонами 2а и 3а жесткого кольца А и протонами 1`а и 1`б подвижного бокового заместителя R_{3β}. Это свидетельствует о том, что независимо от модели расчета внутримолекулярная локальная динамика в явном виде проявляется в превышающих $\pm 5\%$ отклонениях от линейной корреляции между расчетными и экспериментальными расстояниями.

Таким образом, на основании количественных оценок межпротонных расстояний с помощью ЯЭО в тритерпеноиде (1а) можно сделать заключение о том, что прежде чем делать вывод конформационной жесткости или конформационной мобильности таких аксиально-симметричных молекул необходимо сделать поправку на анизотропию их диффузионного движения. При этом для более точных оценок необходимо экспериментальное определение параметра анизотропии D_{\parallel}/D_{\perp} с помощью сопоставления гетероядерных эффектов Оверхаузера ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$) в одной из метиленовых групп CH_2 , которая расположена в этой молекуле так, что радиусы-

векторы связей $\text{H}^{\text{eq}}\text{-C}$ и $\text{H}^{\text{ax}}\text{-C}$ ориентированы параллельно и ортогонально к ее главной оси.

2.3.2 Применение вицинальных констант ($^3J_{\text{H-H}}$) для доказательства конформационной жесткости углеродного скелета тритерпеноида (1a)

Экспериментальные значения 17-ти вицинальных констант $^3J_{\text{H-H}}^{\text{эксп.}}$ между протонами колец А, В, D и Е представлены в **таблице 5**, в которой также находятся расчетные значения соответствующих диэдральных углов $\theta_{ij}^{\text{расч.}}$ и рассчитанных на их основе вицинальных констант $^3J_{\text{H-H}}^{\text{расч.}}$ с помощью Карплусовской зависимости в модификации Альтона и др. [41], учитывающей групповые электроотрицательности заместителей R_1 , R_2 , R_3 и R_4 этанового фрагмента $R_1R_2\text{CH-CHR}_3R_4$, включая электроотрицательности атомов как в α -, так и в β -положениях. Для наглядности для этих семнадцати констант на **Рис. 19** представлен корреляционный график, показывающий уровень соответствия между их расчетными и экспериментальными значениями. Кроме того, в **таблице 5** для сравнения даны экспериментальные вицинальные константы $^3J_{\text{H-H}}^{\text{эксп.}}$ между метиленовыми протонами бокового заместителя в положении 3β и соответствующие расчетные их значения для трех наиболее энергетически выгодных конформаций этанового фрагмента $\text{C}^1\text{-H}_2\text{-C}^2\text{-H}_2$.

Таблица 5

Экспериментальные (ЯМР) и расчетные (ММ2) вицинальные константы $^3J_{\text{H-H}}$ в тритерпеноиде (1a)^{a)}

№	$\text{H}_i\text{-H}_j$	$^3J^{\text{эксп.}}$, Гц	$\theta_{ij}^{\text{расч.}}$, град.	$^3J^{\text{расч.}}$, Гц	$\Delta^3J = ^3J^{\text{расч.}} - ^3J^{\text{эксп.}}$, Гц
1	$1\alpha\text{-}2\alpha$	3.8	-54.3	4.11	0.31
2	$1\alpha\text{-}2\beta$	13.4	-171.6	13.42	0.02
3	$1\beta\text{-}2\alpha$	3.6	61.5	2.72	-0.88
4	$1\beta\text{-}2\beta$	3.6	-55.9	3.83	0.23
5	$2\alpha\text{-}3\alpha$	4.5	55.3	4.45	-0.05
6	$2\beta\text{-}3\alpha$	11.7	173.0	10.99	-0.71
7	$5\alpha\text{-}6\alpha$	2.3	-67.1	1.93	-0.37
8	$5\alpha\text{-}6\beta$	11.8	153.5	12.74	0.94
9	$6\beta\text{-}7\alpha$	12.8	172	13.13	0.33
10	$6\beta\text{-}7\beta$	3.9	56.4	3.63	-0.27
11	$15\alpha\text{-}16\alpha$	3.8	53.1	4.35	0.55
12	$15\alpha\text{-}16\beta$	2.4	-63.5	2.37	-0.03
13	$15\beta\text{-}16\alpha$	13.8	167.6	12.9	-0.9
14	$15\beta\text{-}16\beta$	3.8	51.0	2.83	-0.97
15	$18\beta\text{-}19\alpha$	13.5	-176.2	13.06	-0.44

16	18 β –19 β	4.4	-58.7	3.28	-1.12
17	21 α –22 β	13.0	172.2	13.02	0.02
18 ^{а)}	1`b–2`d	5.3	-58.1	2.18	-3.12
19 ^{а)}	1`b–2`c	9.3	-177.0	12.44	3.14
20 ^{а)}	1`a–2`d	6.0	61.0	1.76	-4.24
21 ^{а)}	1`a–2`c	5.6	-57.9	4.06	-1.54
22 ^{б)}	1`b–2`d	5.3	59.3	3.8	-1.5
23 ^{б)}	1`b–2`c	9.3	-59.6	1.95	7.35
24 ^{б)}	1`a–2`d	6.0	178.2	12.42	6.42
25 ^{б)}	1`a–2`c	5.6	-59.4	1.98	-3.62
26 ^{в)}	1`b–2`d	5.3	-179.6	12.38	7.08
27 ^{в)}	1`b–2`c	9.3	61.5	3.42	-5.88
28 ^{в)}	1`a–2`d	6.0	-60.0	3.68	-2.32
29 ^{в)}	1`a–2`c	5.6	-179.0	12.33	6.73

а) – наиболее предпочтительная конформация (**1a**) (“best1a”: E = 91.08 ккал/моль);

б) – 2-я по энергии конформация (**1a**) (“best2a”: E = 91.25 ккал/моль);

в) – 3-я по энергии конформация (**1a**) (“best3a”: E = 91.9 ккал/моль).

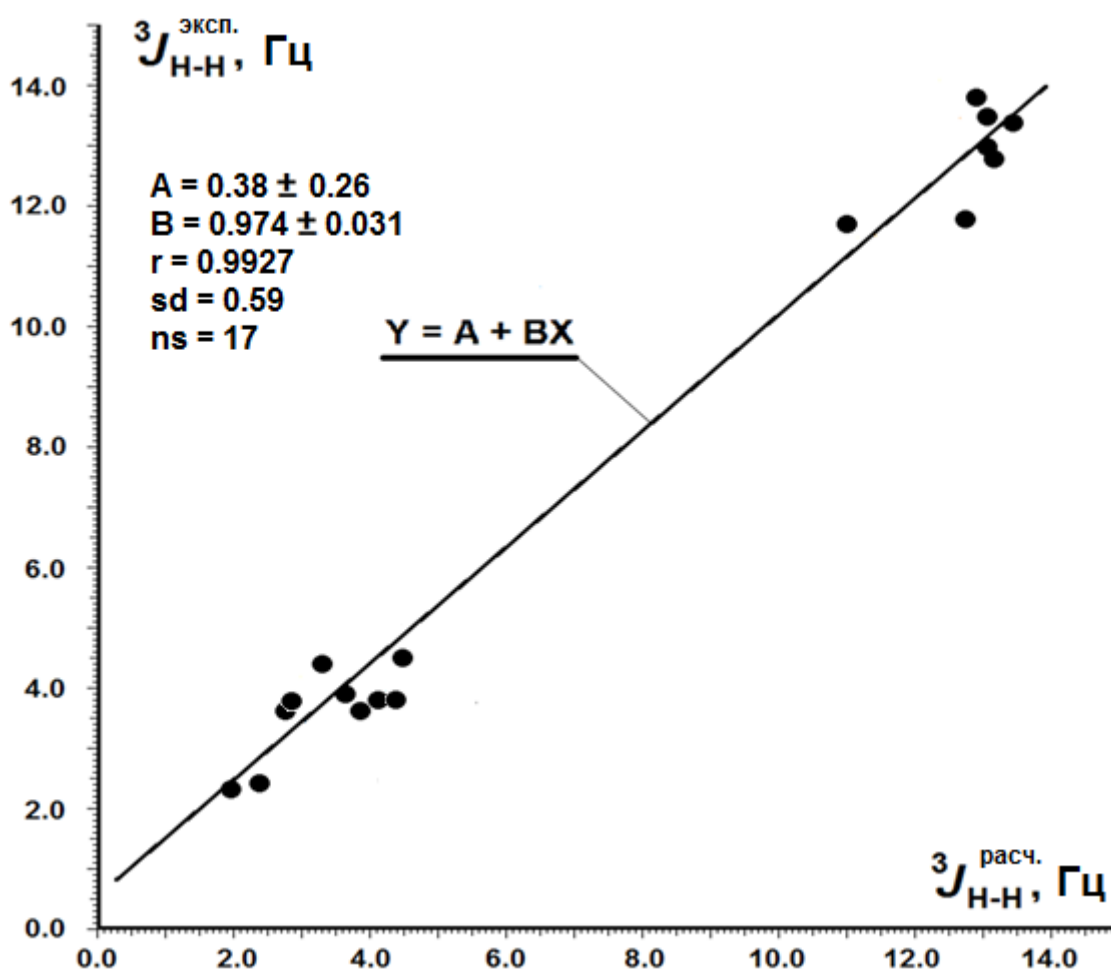


Рис. 19 Корреляции между расчетными (ММ2) и экспериментальными вицинальными константами $^3J_{H-H}$ для пар протонов колец A, B, D и E тритерпеноида (**1a**). Приведены параметры линейной корреляции $Y = \underline{A} + \underline{B}X$, \underline{r} (коэффициент корреляции Пирсона) и \underline{sd} (среднеквадратичное отклонение, в Гц), для \underline{n} (число использованных точек ●).

В последней колонке **таблицы 5** содержатся различия между расчетными и экспериментальными значениями вицинальных констант: $\Delta^3J = {}^3J_{\text{расч.}} - {}^3J_{\text{эксп.}}$, которые характеризуют уровень соответствия расчетной и действительной конформацией тритерпеноида (**1a**) в растворе. Такое сопоставление дает экспериментальное доказательство конформационной жесткости углеродного скелета данной молекулы, поскольку расхождение между расчетными и экспериментальными вицинальными константами для 17-ти пар протонов колец А, В, D и Е в большинстве случаев не превышает 1.0 Гц. Исключение составляет лишь константа ${}^3J_{18\beta-19\beta}$, для которой значение Δ^3J составляет -1.12 Гц. Наиболее вероятное объяснение такого расхождения служит известная закономерность, заключающаяся в том, что расчетные вицинальные константы между мостиковыми протонами (или с участием мостиковых протонов) имеют заниженные значения по сравнению с экспериментальными данными [44]. Таким образом, в целом наблюдается достаточно хорошая корреляция между расчетными и экспериментальными вицинальными константами (**Рис. 19**), которая характеризуется среднеквадратичным отклонением $sd = 0.59$ Гц, что вполне соответствует известным данным работы [41] по статистической оценке точности использованной модификации уравнения Карплуса ${}^3J_{H-H} = f(\theta)$.

Совершенно иное соотношение между расчетными и экспериментальными вицинальными константами наблюдается для четырех пар протонов этанового фрагмента $C^1-H_2-C^2-H_2$ бокового заместителя в положении 3β , которые обозначены также как и в **таблице 5** с помощью букв “a”, “b”, “c” и “d”. Из сопоставления этих данных хорошо видно, что ни для одной из трех конформаций (см. сноски “a”, “b” и “в” к **таблице 5**) тритерпеноида (**1a**), связанных с вращением вокруг связи C^1-C^2 , не наблюдается даже качественного соответствия констант ${}^3J_{\text{расч.}}$ и ${}^3J_{\text{эксп.}}$. Например, в случае второго по населенности конформера (см. сноску “б”) это различие для константы ${}^3J_{1^b-2^c}$ достигает 7.35 Гц. Такое очевидное несовпадение расчетных и экспериментальных данных может быть объяснено только существованием быстрого в шкале времени ЯМР конформационного равновесия между указанными тремя формами. Поэтому для корректного количественного анализа экспериментальных данных дополнительно требуется провести процедуру усреднения каждой из расчетных вицинальных констант с учетом населенности каждого из конформационных состояний. Такой анализ выходит за рамки данной работы,

которая направлена преимущественно на получение доказательств существования внутримолекулярных динамических процессов или их отсутствие, а не на их подробное изучение, что может в дальнейшем стать логичным продолжением данного исследования.

Таким образом, исследование тритерпеноида (**1a**) с помощью количественных оценок двух независимых параметров спектроскопии ЯМР – протон-протонных ядерных эффектов Оверхаузера и вицинальных констант $^3J_{H-H}$ показывает полное совпадение вывода каждого из этих подходов о жесткости углеродного скелета колец А – Е этой молекулы, а также свидетельствует о взаимном соответствии результатов каждого из них [45,46].

2.4 Использование измерения вицинальных констант ($^3J_{H-H}$) в спектрах ЯМР тритерпеноида (**2a**) для доказательства конформационной подвижности кольца А

Аналогичная процедура применения вицинальных констант $^3J_{H-H}$ для исследования конформационной жесткости углеродного скелета тритерпеноидов была использована для молекул (**2a**) и (**2б**), которые отличаются структурой заместителей в положении 3 кольца А. Если в случае тритерпеноида (**2б**) для протонов кольца А обнаружилось хорошее качественное и количественное соответствие между расчетными и экспериментальными значениями вицинальных констант (Рис. 20).

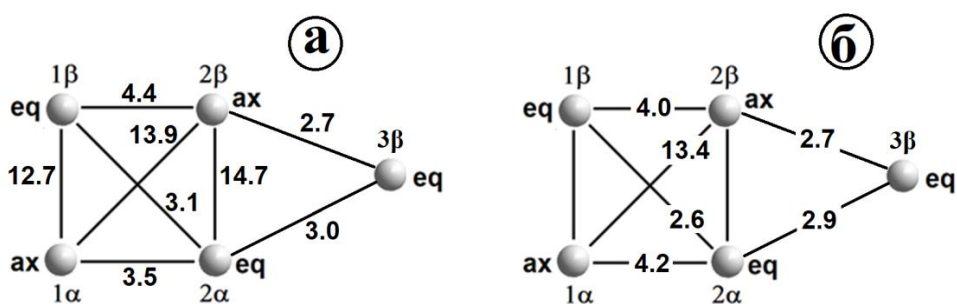


Рис. 20 Схема связывания протонов кольца А для тритерпеноида (**2б**), на которой цифрами указаны (в Гц) наблюдаемые (**а**) и рассчитанные (**б**) вицинальные константы.

В то же время для тритерпеноида (**2a**), имеющего карбонильную группу в положении 3, экспериментальные значения констант $^3J_{1\alpha-2\alpha}$, $^3J_{1\alpha-2\beta}$, $^3J_{1\beta-2\alpha}$ и $^3J_{1\beta-2\beta}$ были определены методом DQF-COSY и представлены на Рис. 21-1.

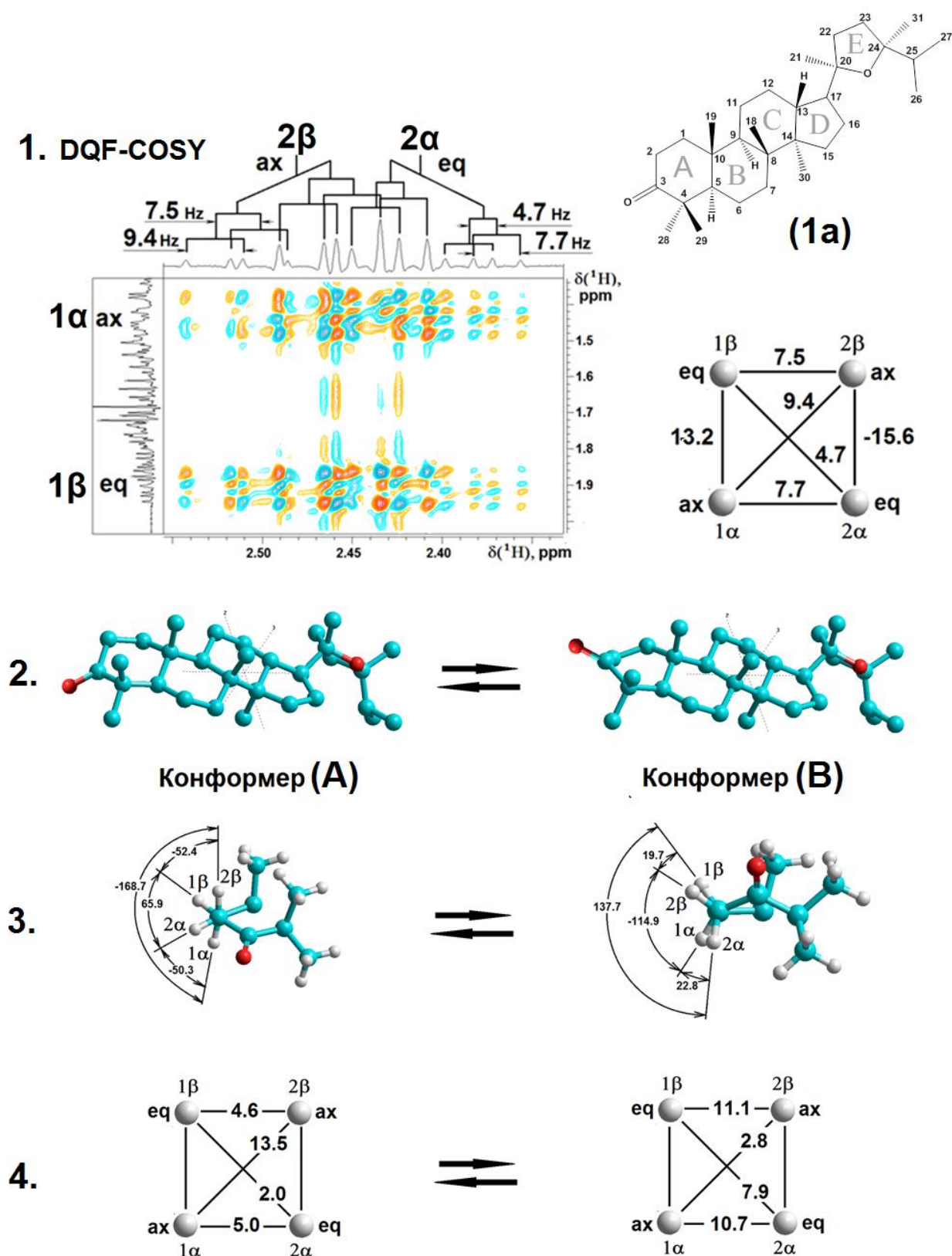


Рис. 21 1. – Фрагмент спектра DQF-COSY тритерпеноида (**2a**) и схема связывания протонов кольца A, на которой цифрами (в Гц) указаны наблюдаемые скалярные константы.

Конформационный обмен в кольце A, показанный с помощью **2.** – углеродных скелетов конформеров (A) и (B) и **3.** – Ньюменовских проекций по связи C²–C¹. 4. Расчетные значения вицинальных констант, полученные для конформеров (A) и (B) с использованием метода MM2 и модификации Карплусовской зависимости.

Эти экспериментальные значения оказались несоответствующими расчетным данным ни для одной из двух энергетически предпочтительных конформаций, в одной из которых кольцо А имело пространственное строение, соответствующее форме типа “псевдо-кресло” (в дальнейшем – конформер (А)), а в другой – пространственное строение, соответствующее “твист”-форме (конформер (В)).

На **Рис. 21.2** показаны углеродные скелеты конформеров (А) и (В), которые находятся в растворе в состоянии быстрого конформационного равновесия (А) \rightleftharpoons (В) и объясняют несоответствие наблюдаемых ($^3J_{H-H}^{эксп.}$) и расчетных ($^3J_{H-H}^{расч.}$) вицинальных констант. На **Рис. 21.3** показаны Ньюменовские проекции этих конформеров по связи C^2-C^1 и цифрами даны значения (в градусах) диэдральных углов θ_{ij} , полученных с помощью оптимизации геометрии этих конформеров методом ММ2, а на **Рис. 21.4** показаны схемы связывания протонов в кольце А и для конформеров (А) и (В) приведены два набора значений расчетных вицинальных констант $\{^3J_{H-H}^{(A)расч.}\}$ и $\{^3J_{H-H}^{(B)расч.}\}$, полученных с использованием соответствующих углов θ_{ij} и с применением модифицированного уравнения Карплуса [41].

Полученные наборы вицинальных констант $\{^3J_{H-H}^{(A)расч.}\}$ и $\{^3J_{H-H}^{(B)расч.}\}$ были в дальнейшем использованы для оценки соотношения конформеров (А) и (В) путем построения (**Рис. 22**) четырех линейных зависимостей усредненных быстрым в шкале времени ЯМР конформационным обменом расчетных значений этих констант $\langle ^3J_{H-H}^{расч} \rangle$ от соотношения населенностей конформеров P_A и P_B по формуле:

$$\langle ^3J_{H-H}^{расч} \rangle = P_A(^3J_{H-H}^{(A)расч.}) + P_B(^3J_{H-H}^{(B)расч.}), \text{ где } P_A + P_B = 1$$

Следует отметить, что представленный графический подход с использованием нескольких вицинальных констант дает возможность повысить точность оценки доли минорного конформера (В), поскольку сразу три из четырех константы дают практически одинаковое (в пределах погрешности $\pm 2\%$) значение $P_B = 46\%$. Результат использования для этой же цели вицинальной константы $^3J_{1\alpha-2\beta}$ довольно сильно (на 8%) отличается от указанного выше значения в сторону его уменьшения ($P_B = 38\%$). Учитывая характер Карплусовской зависимости $^3J_{H-H} = f(\theta)$, наиболее вероятной причиной такого расхождения может быть неточность расчетных значений константы $^3J_{1\alpha-2\beta}$ в области диэдральных углов в окрестности 180° в конформере (А) и в области диэдральных углов в окрестности 90° в конформере (В).

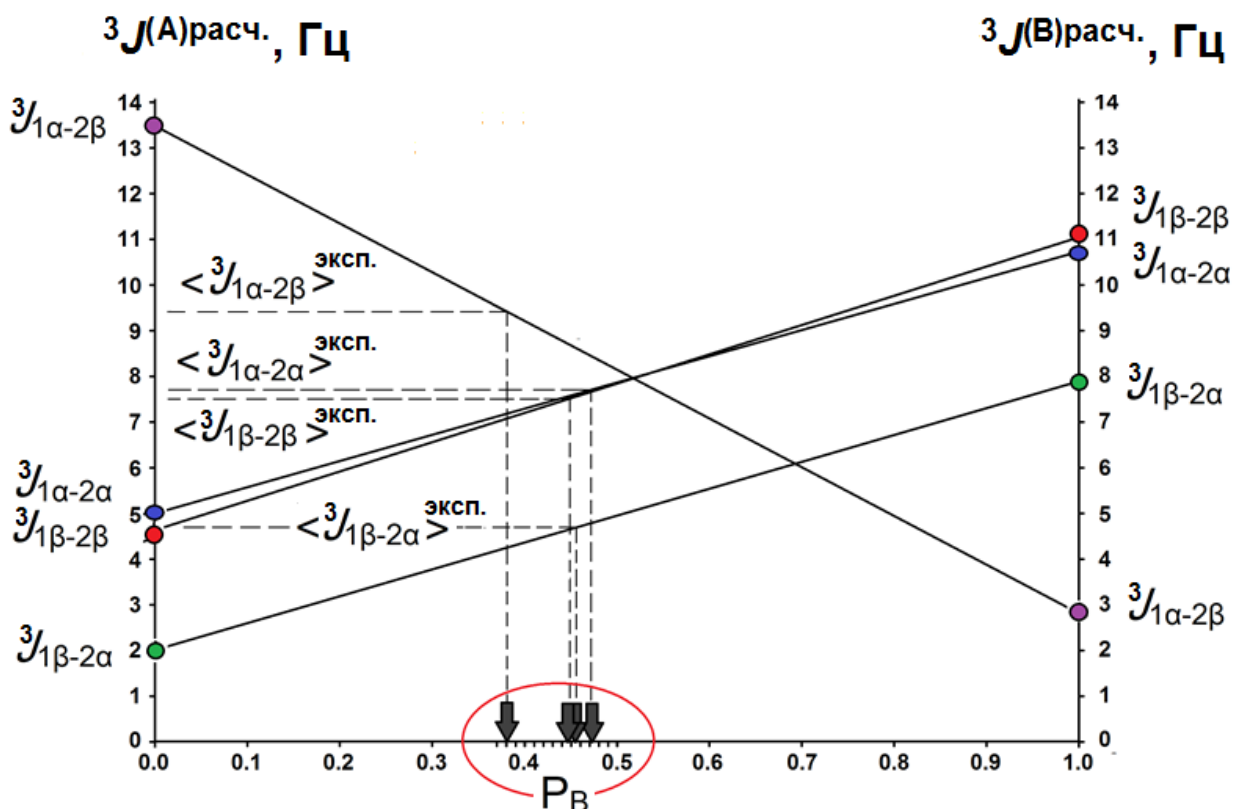


Рис. 22 Расчетные значения вицинальных констант ${}^3J_{\text{H-H}}^{\text{расч.}}$ для конформеров (А) и (В) тритерпеноида (2а) и линейные зависимости соответствующих усредненных констант $\langle {}^3J_{\text{H-H}}^{\text{расч.}} \rangle$ от населенности P_B . Пунктирными линиями показана процедура оценки доли конформера (В) с помощью экспериментальных значений этих констант.

Это позволяет утверждать, что оценка соотношения конформеров тритерпеноида (2а), полученная на основании количественного использования вицинальных констант ${}^3J_{1\alpha-2\alpha}$, ${}^3J_{1\beta-2\beta}$ и ${}^3J_{1\beta-2\alpha}$, является более достоверной и составляет: $P_A : P_B = 54 : 46$.

2.5 Использование измерений вицинальных констант ${}^3J_{\text{H-H}}$ и ЯЭО для конформационного анализа тритерпеноида (3)

В данном разделе рассматриваются особенности конформационного ЯМР-анализа тритерпеноида (3), который в положении 2 содержит два сотруктурно одинаковых заместителя $R_{2\alpha}$ и $R_{2\beta}$ (см. спектр ЯМР ${}^1\text{H}$ и структуру соединения (3) на Рис. 1). Эти особенности заключаются в различии спектральных и релаксационных характеристик указанных заместителей, углеродные и водородные атомы которых имеют разные штриховые индексы – «`» и «``», соответственно, а протоны их этановых фрагментов $\text{C}^1\text{H}_2\text{--C}^2\text{H}_2$, также как и в случае тритерпеноида (1а), обозначены как “a”, “b”, “c” и “d”. Аналогичным образом обозначены сигналы

указанных протонов в спектрах ЯМР DQF-COSY (1), NOESY (2), ^1H (3) и в схеме связывания (4), представленных на Рис. 23.

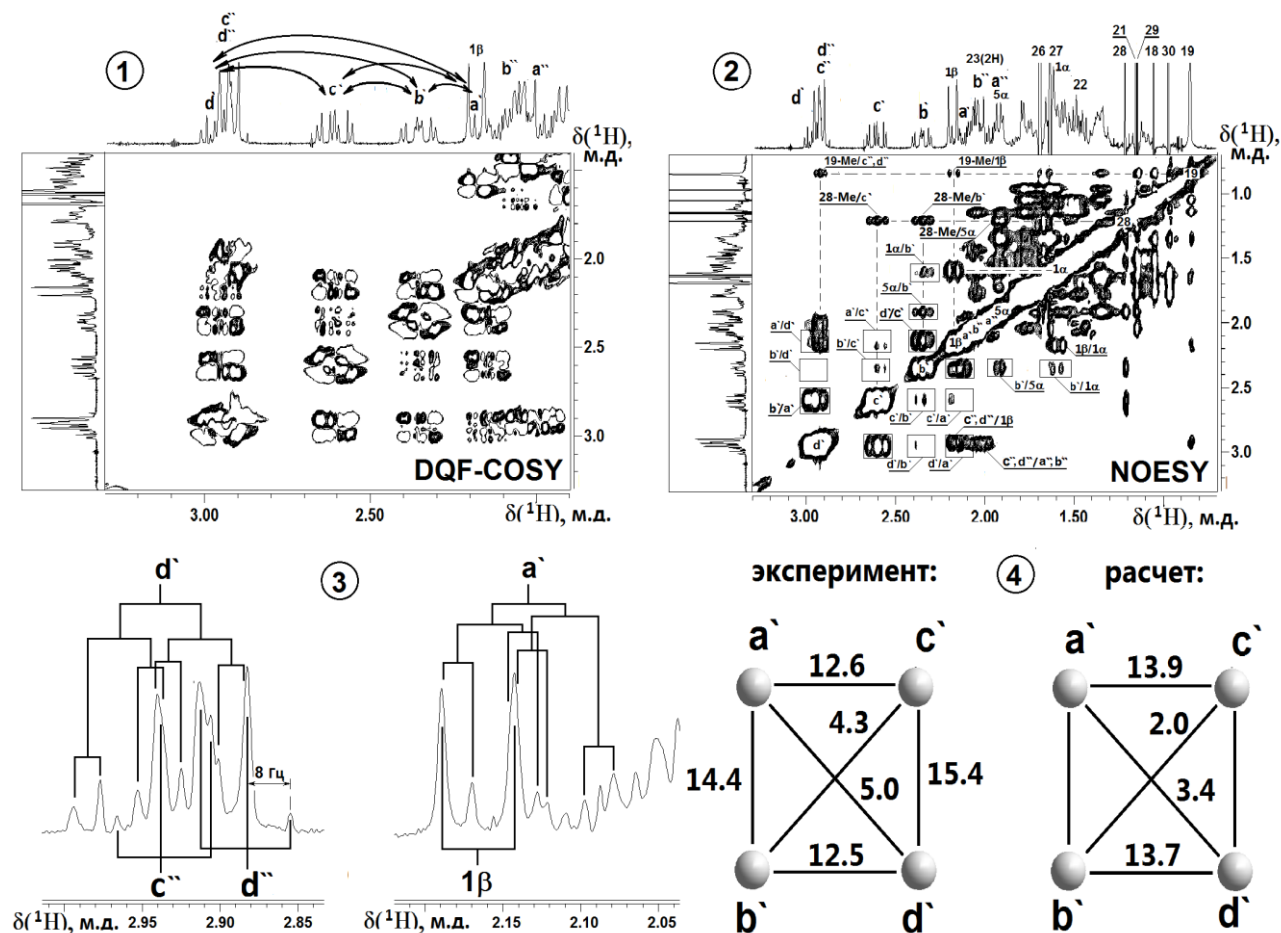


Рис. 23 Фрагменты спектров DQF-COSY (1), NOESY при $\tau_m = 0.4$ с (2) и ЯМР ^1H (3) тритерпеноида (3) в CD_3OD , полученных на частоте 300 МГц. 4 – Схема связывания между протонами этанового фрагмента заместителя $\text{R}_{2\alpha}$, на которой цифрами (в Гц) даны значения экспериментальных и расчетных скалярных констант. На фрагментах спектра ЯМР ^1H (3) с помощью линий показаны мультиплетные структуры двух групп перекрывающихся протонных сигналов: “a”, “a’”, “b’” и “d”, “1β”.

Прежде всего, это различие проявляется в разном характере расположения сигналов этих протонов в спектре ЯМР ^1H : в случае заместителя $\text{R}_{2\alpha}$ все четыре сигнала располагаются в интервале 2.0 – 3.0 м.д. практически эквидистантно, а в случае заместителя $\text{R}_{2\beta}$ сигналы пар геминальных протонов “a’”, “b’” и “c’”, “d’” перекрываются между собой, соответственно, при 2.03 и 2.91 м.д. и образуют две сильносвязанные системы АВ-типа по геминальной константе $^2J_{\text{H-H}}$. Очевидной причиной такого различия является неодинаковое пространственное расположение сравниваемых протонов относительно магнитно-анизотропной карбонильной группы в положении 3.

Второе существенное различие заключается в совершенно разном наборе скалярных констант между протонами “a” – “d” в заместителях R_{2α} и R_{2β}, что отражается на мультиплетной структуре соответствующих сигналов. В случае заместителя R_{2α} все четыре сигнала имеют практически одинаковую мультиплетную структуру, которую можно охарактеризовать как дублет дублета дублетов (ддд) с двумя большими различающимися между собой константами (геминальной и *транс*-вицинальной) и одной небольшой по величине вицинальной константой $\sim(4.0 - 5.0)$ Гц, характерной для диэдральных углов $\theta \approx 60^\circ$ (см. структуру кросс-пиков в спектре DQF-COSY на **Рис. 23-1**).

Для заместителя R_{2β} наблюдается совершенно иная мультиплетность сигналов протонов “a” – “d”. Все они имеют структуру дублета триплетов со следующими величинами констант: одной $\sim(14 - 15)$ Гц, которая является геминальной $^2J_{H-H}$, и двух (около 8 Гц), соответствующих вицинальным константам $^3J_{H-H}$. Однако, в данном случае из-за сближенности сигналов протонов “a” и “b” невозможно утверждать, что эти значения вицинальных констант являются следствием динамического усреднения, а не результатом эффектов сильносвязанности в системе типа “AB–MN”.

Наконец, невозможно не заметить различий в проявлении ядерных эффектов Оверхаузера для протонов каждого из заместителей R_{2α} и R_{2β} между собой и с протонами кольца А. На **Рис. 23-2** представлен фрагмент спектра NOESY, на котором с помощью прямоугольных рамок показаны все кросс-пики между сигналами протонов этанового фрагмента C¹H₂–C²H₂, а также указаны их пространственные взаимодействия с другими ближайшими протонами. Особенно важными для определения пространственного расположения заместителя R_{2α} являются кросс-пики 28-Me/b¹, 28-Me/c¹, 5α/b¹ и 1α/b¹, а для заместителя R_{2β} – кросс-пики 19-Me/c², d² и 1β/c², d², которые дают вполне определенное представление о преимущественной пространственной ориентации заместителей R_{2α} и R_{2β} по отношению к кольцу А, находящемуся в “твист”-форме как это показано на **Рис. 24**.

Следует особо отметить, что перечисленный набор пространственных взаимодействий невозможен при кресловидной конформации кольца А, в случае которой ориентация карбонильной группы C³=O должна быть направлена в α-область, а заместитель R_{2β} должен был бы занимать псевдоаксиальное положение, при

котором неизбежно возникало бы его сильное стерическое взаимодействие с метильной группой 19.

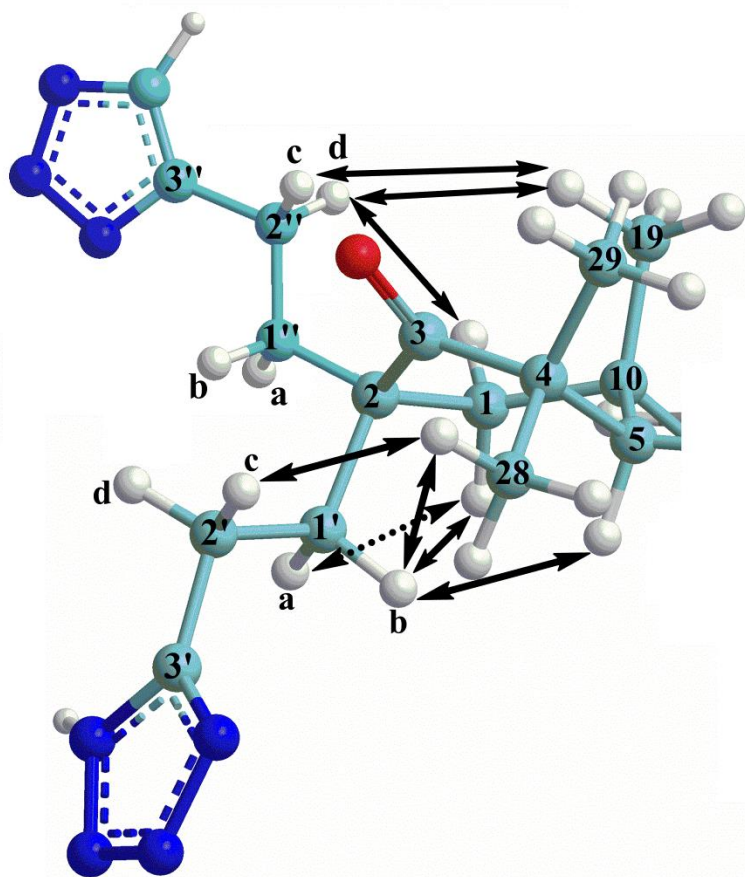


Рис. 24 Фрагмент молекулы тритерпеноида (3), на котором стрелками показаны наиболее существенные пространственные взаимодействия (ЯЭО) между метиленовыми протонами, соответственно, заместителей $R_{2\alpha}$ и $R_{2\beta}$ и ближайшими протонами кольца А. Взаимодействие $1\alpha/a'$ показано пунктиром, поскольку оно не может наблюдаться из-за наложения сигналов протона “1'a” и “1'β”.

Но самое неожиданное, что было обнаружено в спектре NOESY это значительное ослабление кросс-пиков между вицинальными протонами соседних метиленовых групп в заместителе $R_{2\alpha}$ по сравнению с ожидаемыми значениями. Такое ослабление не наблюдается в заместителе $R_{2\beta}$ и в спектре NOESY (см. **Рис. 23-2**) хорошо виден достаточно интенсивный кросс-пик $c'', d''/a'', b''$, отражающий сумму пространственных взаимодействий c''/b'' и d''/a'' , которые соответствуют расстояниям около 2.5 Å между указанными протонами в преимущественной конформации, представленной на **Рис. 24**. В данном случае мы не учитываем вклад в этот суммарный кросс-пик “транс”-взаимодействий c''/a'' и d''/b'' , которые

соответствуют расстояниям около 3.1 Å, и, следовательно, должны быть в 3.6 раза слабее.

На количественном уровне кросс-пик $c'', d''/a'', b''$ имеет приведенную интегральную интенсивность ~13% и при сопоставлении его с кросс-пиком b'/a' , соответствующим расстоянию 1.8 Å между геминальными протонами и имеющим приведенную интегральную интенсивность ~29%, имеет хорошее количественное соответствие с двумя одинаковыми вкладами от взаимодействий между парами протонов, находящихся на расстояниях 2.5 Å:

$$1.8 (29/(13 \cdot 0.723:2))^{1/6} = 1.8 (29/4.7)^{1/6} = 1.8(6.17)^{1/6} = 1.8 \cdot 1.354 = 2.44 \text{ Å}.$$

Таким образом, в случае заместителя $R_{2\alpha}$ должны наблюдаться аналогичные соотношения приведенных интегральных интенсивностей между парами геминальных и вицинальных протонов, которые должны различаться примерно в 6.2 раза для “*цис*”-взаимодействий c'/b' и d'/a' , соответствующих расстояниям 2.5 Å, и еще в 3.6 раз меньше (т.е. всего $6.2 \cdot 3.6 = 22.3$ раза) для “*транс*”-взаимодействий c'/a' и d'/b' . Однако, эти соотношения в случае заместителя $R_{2\alpha}$ не нашли экспериментального подтверждения. Более того, кросс-пики “*транс*”-взаимодействий не только ослаблены по сравнению с расчетными данными, но и имеют противоположный знак, по сравнению с данными для “*цис*”-взаимодействий. Эти необычные кросс-пики, знак которых совпадает со знаком диагональных кросс-пиков, формально соответствуют пределу спиновой диффузии ($\omega_0 \tau_c \gg 1$), а не пределу экстремального сужения линий ($\omega_0 \tau_c \ll 1$), что является аномальным явлением для ядерный эффект Оверхаузера в “малых” молекулах. Таким образом, пространственные “*цис*”-взаимодействия в заместителе $R_{2\alpha}$ ослаблены примерно 3-4 раза сильнее, чем это следует из расчетных данных, а более слабые “*транс*”-взаимодействия оказались за пределами применения калибровочного метода оценки расстояний.

Возможным объяснением этого наблюдения является скалярная релаксация 1-го рода, экспериментальное подтверждение которой обладает самостоятельной ценностью. Поэтому для подтверждения этой гипотезы были проведены дополнительные эксперименты по измерению ЯЭО при различных временах смешивания. Эти измерения одновременно давали возможность устранить (или значительно ослабить) эффекты вклада в кросс-релаксацию нуль-квантовых

когерентностей, поскольку при регистрации ЯЭО между скалярно связанными спинами эти эффекты усредняются за счет случайного варьирования времени смешивания [47]. Результаты этих измерений даны в **таблице 6**.

Таблица 6

Экспериментальная зависимость приведенных значений интенсивностей кросс-пиков (S_{ij}/S_{jj}) в спектрах NOESY тритерпеноида (**3**) от времени смешивания τ_m :

$$S_{ij}/S_{ii} = f(\tau_m)^{*})$$

№ ^{**)}	τ_m , с	$S_{(H_i-H_j)}/S_{ii}$					
		$c^{\prime}-d^{\prime}/c^{\prime}$	$d^{\prime}-b^{\prime}/d^{\prime}$	$b^{\prime}-d^{\prime}/b^{\prime}$	$b^{\prime}-c^{\prime}/b^{\prime}$	$c^{\prime}-a^{\prime}/c^{\prime}$	$b^{\prime}-a^{\prime}/b^{\prime}$
1 (4)	0.2	-8.3	0.4	1.23	0.56	1.2	-5.7
2 (1)	0.4	-20.0	0.35	1.22	-1.5	0.6	-21.0
3 (2)	0.6	-27.4	2.22	3.4	-0.17	2.3	-23.5
4 (3)	0.8	-31.1	3.6	12.4	-2.5	6.0	-27.3
5 (5)	1.0	-33.1	5.1	13.7	-0.3	4.0	-30.4
6 (6)	1.2	-41.8	8.4	17.6	-4.6	6.4	-24.4
7 (7)	1.4	-46.1	14.2	15.1	-6.6	10.3	-18.1

^{*)} – Отрицательный знак приведенного кросс-пика S_{ij}/S_{ii} соответствует положительному ЯЭО;

^{**)} – в скобках указаны номера соответствующего спектра NOESY.

Из приведенных данных хорошо видно, что кросс-пики d^{\prime}/b^{\prime} , b^{\prime}/d^{\prime} и c^{\prime}/a^{\prime} , соответствующие “*транс*”-взаимодействиям, имеют аномальный положительный знак для всех значений времени смешивания τ_m , а их интегральная интенсивность увеличивается пропорционально этому времени. В то же самое время кросс-пик и b^{\prime}/c^{\prime} , соответствующий более сильным “*цис*”-взаимодействиям, при коротких временах смешивания ($\tau_m \leq 0.2$ с) имеют положительный знак (+0.56), но затем при увеличении τ_m становятся отрицательными и увеличиваются (по абсолютному значению) до -6.6, точно также как увеличиваются кросс-пики c^{\prime}/d^{\prime} и b^{\prime}/a^{\prime} , соответствующие пространственным взаимодействиям между геминальными протонами.

Такое поведение кросс-пиков между вицинальными протонами в зависимости от τ_m вполне соответствует конкуренции диполь-дипольного и скалярного вкладов в кросс-релаксацию. При малых временах смешивания вклад диполь-дипольной релаксации в наблюдаемый нестационарный ЯЭО невелик и скалярная релаксация 1-го рода является доминирующей, что объясняет положительные кросс-пики для всех пар (“*цис*”- и “*транс*”-) вицинальных протонов. При увеличении времени смешивания для пары протонов b^{\prime} - c^{\prime} , находящихся в преимущественной конформации на расстоянии ~ 2.5 Å, вклад диполь-дипольной релаксации становится преобладающим

и знак кросс-пика меняется на противоположный – отрицательный, что соответствует положительному ЯЭО.

В случае пар “транс”-протонов d⁻b⁻ и c⁻-a⁻, расстояния между которыми значительно больше (~3.1 Å), увеличение диполь-дипольного вклада с увеличением времени смешивания оказывается менее значительным и вклад скалярной релаксации первого рода остается доминирующим и определяет положительный знак кросс-пигов, соответствующих более слабым пространственным “транс”-взаимодействиям, происходящих по диполь-дипольному механизму.

Таким образом, обнаружение вклада скалярного механизма релаксации 1-го рода в наблюдаемую кросс-релаксацию в заместителе R_{2α} дает основание для качественной оценки его конформационной подвижности, связанной с вращением (или псевдовращением) вокруг связи C¹–C². Поскольку реализация механизма скалярной релаксации 1-го рода и возможность ее влияния на продольную компоненту намагниченности, с которой связан ЯЭО, в сильной степени зависит от соотношения скорости процесса, приводящего к зависимости наблюдаемой скалярной константы от времени $\langle^3J(t)\rangle$, и разницы ларморовых частот взаимодействующих спинов, то в условиях быстрого в шкале времени ЯМР конформационного обменного процесса обнаружение эффектов скалярной релаксации 1-го рода означает, что скорость этого процесса сравнительно невелика и сопоставима разностью химических сдвигов взаимодействующих протонов, то есть составляет около 100 Гц.

Следует отметить, что эффекты скалярной релаксации 1-го рода могут возникать преимущественно в случае сильносвязанных спиновых систем, даже если эта сильносвязанность реализуется лишь для одного из конформеров, населенность которого не является основной. Необходимость этого замечания связана с тем, что сравнение экспериментальных и расчетных вицинальных констант для этанового фрагмента заместителя R_{2α}, которые представлены на **Рис. 23-4**, показывает, что доля доминирующей конформации составляет не менее 90%. Следовательно, обнаружить конформационный обмен обычным способом с помощью понижения температуры и наблюдения за изменением формы линий участвующих в обменном процессе сигналов крайне затруднительно. Однако, все эти проблемы, связанные с эффектами скалярной релаксацией 1-го рода и ее использованием в конформационном анализе, выходят за рамки темы данной работы и требуют отдельного дальнейшего изучения,

в котором тритерпеноид (3) может быть использован в качестве модельного соединения.

2.6 Заключение

Любая работа обладает одним свойством – она рано или поздно заканчивается. Подведение ее итогов должно включать не только сопоставление начальной цели работы и степень ее достижения, но и возможность предсказания наиболее перспективных направлений дальнейших исследований в данной области и способов практического применения полученных результатов.

Поскольку цель работы была сформулирована как “установление пространственного строения модифицированных аналогов тритерпеноидов и обнаружение быстрых в шкале времени ЯМР ^1H конформационных превращений на основе количественных оценок косвенных и прямых межпротонных взаимодействий с учетом особенностей спектральных и релаксационных характеристик этих молекул”, то главным вопросом, на который было необходимо ответить, был вопрос об апробации возможностей и об оптимизации методологии количественной спектроскопии ЯМР (qNMR) [12–14] для решения задач конформационного анализа такого семейства природных продуктов как тритерпеноиды.

В процессе работы на основании литературных данных, опыта аналогичного изучения структурно близких стероидных молекул и предварительной оценки релаксационных характеристик тритерпеноидов были выявлены основные проблемы использования спектроскопии ЯМР на ядрах ^1H , параметры которой ($^3J_{\text{H-H}}$ и $\text{B}_{\text{H-H}}$) были выбраны в качестве основных количественных критериев конформационной жесткости или лабильности исследуемых молекул. К этим проблемам, безусловно, относится хорошо известная перегруженность алифатической области спектра тритерпеноидов и сложность спектральной идентификации сигналов, а необходимость использования спектрометра ЯМР на сравнительно низкой частоте (300 МГц) из-за опасности выхода на нелинейный участок зависимости $\text{B}_{\text{H-H}} = f(\omega_0, \tau_c)$ делает задачу по отнесению протонных сигналов и по количественному определению $^3J_{\text{H-H}}$ и $\text{B}_{\text{H-H}}$ еще более сложной, поскольку одновременно в спектре ЯМР ^1H возрастает возможность возникновения эффектов сильносвязанности. Тем не менее на примере изучения спектров ЯМР нескольких модельных тритерпеноидов было показано, что комбинированное использование нескольких гомо- и гетероядерных

корреляционных методов спектроскопии ЯМР позволяет успешно решать такие задачи, включая точное определение значений наиболее важных для конформационного анализа ЯМР-характеристик – вицинальных констант $^3J_{H-H}$ и скоростей кросс-релаксации ρ_{H-H} .

В работе показано, что прямое количественное сопоставление экспериментальных и расчетных спектральных ($^3J_{H-H}$) и релаксационных (ρ_{H-H}) характеристик спектроскопии ЯМР 1H является надежным критерием для доказательства конформационной жесткости или обнаружения конформационной мобильности тритерпеноидов.

Следует особо отметить использованную в работе экспериментальную процедуру получения и обработки данных, по количественной оценке межпротонных расстояний $r_{H-H}^{эксп.}$ в условиях использования режима неполного релаксационного восстановления намагниченности при накоплении спектров NOESY (режим Fast NOESY). Процедура получения этих данных включала прямое измерение скоростей кросс-релаксации с помощью графического построения и анализа зависимости нестационарных ЯЭО от времени смешивания τ_m , а процедура обработки данных, помимо обычных для фазочувствительных спектров коррекций фазы и базовой плоскости, в качестве важных элементов включала применение относительных, а не абсолютных, значений объемных интегралов кросс-пиков в спектрах NOESY (процедура *PANIC*).

Кроме того, особое внимание в работе было уделено коррекции экспериментальных результатов, необходимость которой обусловлена анизотропией вращательной диффузии аксиально-симметричных тритерпеноидных молекул в растворе. При этом для определения параметра анизотропии диффузии D_{\parallel}/D_{\perp} исследованного тритерпеноида (**1a**) был использован экспериментальный, а не расчетный подход, основанный на измерении и сопоставлении гетероядерных эффектов Оверхаузера ($^1H \rightarrow ^{13}C$) в одной из метиленовых групп этой молекулы. Было показано, что экспериментальная величина параметра анизотропии $D_{\parallel}/D_{\perp} = 12 \pm 2$ более чем в 1.5 раза превышает его расчетное значение. Следовательно, эффективность коррекции экспериментальных межпротонных расстояний $r_{H-H}^{эксп.}$ при использовании экспериментального параметра анизотропии оказывается значительно выше, чем в случае использования его расчетного значения, полученного на

основании сопоставления моментов инерции вокруг главной и ортогональной осей симметрии изучаемой молекулы.

Таким образом, в результате проведенного исследования было не только установлено пространственное строение нескольких модифицированных аналогов тритерпеноидов и получено экспериментальное доказательство существования быстрых в шкале времени ЯМР ^1H конформационных превращений в некоторых из них, но и успешно апробирована и оптимизирована методология количественного конформационного ЯМР-анализа тритерпеноидов, являющихся одним из наиболее представительных семейств природных соединений. Эта методология несомненно может быть рекомендована для установления пространственного строения и обнаружения быстрых в шкале времени ЯМР конформационных превращений других разновидностей природных тритерпеноидов и их синтетических аналогов [45,46].

При выполнении данной работы был отмечен ряд специфических особенностей применения методов спектроскопии ЯМР ^1H к исследованию пространственного строения тритерпеноидов. Прежде всего, следует указать на уменьшение эффективности использования метода J-COSY для тритерпеноидов по сравнению со стероидами из-за увеличения времени корреляции диффузионного движения τ_c , связанного с увеличением молекулярного веса, и соответствующего сокращения естественного времени жизни спиновых состояний, приводящего к уширению компонент мультиплетных сигналов и потере разрешающей способности указанного метода. Кроме того, в процессе исследования тритерпеноида (**1a**) было обнаружено дальнейшее скалярное взаимодействие через 5 связей ($^5J_{\text{H-H}}$) между протоном 9α и протонами метильной группы 27, которое не может быть объяснено классическим “W”-типа пространственным расположением этих связей, а при изучении тритерпеноида (**3**) были обнаружены признаки вклада в кросс-релаксацию скалярного механизма релаксации, который приводит к уменьшению наблюдаемого ЯЭО и даже к инверсии его знака на противоположный. Все перечисленные выше наблюдения необычны и интересны как в теоретическом, так и в практическом отношении для конформационного ЯМР-анализа природных соединений и несомненно могут стать достойным предметом дальнейших исследований.

Необходимо отметить еще одну важную особенность данной работы. Она заключается в том, что ее очевидная методологическая направленность совпадает с

общей тенденцией современного развития спектроскопии ЯМР, заключающейся в индивидуализации ее применения к различным группам химических соединений. Спектроскопия ЯМР природных соединений в этом отношении оказалась максимально вовлеченной в этот бесконечный процесс оптимизации и адаптации огромного числа новых методов и способов получения и обработки ЯМР-информации. Очевидной причиной этого является не только огромное число продуктов природного происхождения, многие из которых играют ключевую роль в жизненно важных процессах, но и сложность установления их строения и исследования динамических свойств.

Среди множества эффектных примеров использования ЯМР для анализа структуры различных семейств природных соединений, включая терпены, стероиды и углеводы, можно выделить историю установления строения стрихнина, известного в Европе еще с XVI-века. Он был выделен в чистом виде в 1818 году и в течение следующего столетия его структура привлекала внимание многих исследователей. Этот процесс был отмечен двумя Нобелевскими премиями и лишь в середине 50-х годов прошлого века структура стрихнина была установлена. Сегодня такая задача при определенном опыте работы и наличии спектрометра ЯМР с рабочей частотой (300-600) МГц может быть решена в течение 24 часов [48]. Однако, этот хорошо известный и неоднократно описанный в литературе стрихнин в 2011 году благодаря спектроскопии ЯМР преподнес еще один сюрприз – с помощью точных количественных оценок межпротонных расстояний на основе ЯЭО (т.е. точно таким же образом, как и в данной работе) было обнаружено конформационное равновесие между двумя формами. При этом было установлено, что доля минорного конформера составляет всего 2% [49].

Таким образом, процесс познания бесконечен, а развитие и совершенствование методологии спектроскопии ЯМР является одним из решающих факторов этого процесса...

Выводы

1. Экспериментально доказано, что тритерпеноид (**1a**), принадлежащий олеанановому ряду, имеет *цис*-сочленение колец D и E, а пары смежных колец A/B и B/C имеют *транс*-сочленение. Этот тритерпеноид является конформационно жестким и в растворе углеродный скелет колец A, B, D и E имеет конформацию “кресло”.
2. Тритерпеноид (**2a**), принадлежащий даммарановому ряду и содержащий карбонильную группу в положении 3, существует в растворе в виде быстрого в шкале времени ЯМР конформационного равновесия типа “кресло” \rightleftharpoons “твист” кольца A. Согласно экспериментальным данным населенность минорного конформера, имеющего “твист”-форму кольца A, при температуре 20 °C составляет около 46%. Тритерпеноид (**3**), принадлежащий этому же ряду, но имеющий два тетразолилэтиловых заместителя в положении 2, существует в растворе в одной конформации, в которой кольцо A имеет “твист”-форму.
3. На примере конформационно жесткого тритерпеноида (**1a**) показана возможность точной (в пределах $\pm 5\%$) оценки межпротонных расстояний с помощью калибровочного метода и с учетом анизотропии диффузии аксиально-симметричных тритерпеноидных молекул.
4. Параметр анизотропии диффузии D_{\parallel}/D_{\perp} для тритерпеноида (**1a**) был экспериментально установлен с помощью сопоставления гетероядерных эффектов Оверхаузера ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$) в одной из метиленовых групп и он оказался более чем в полтора раза больше его расчетного значения.
5. На основании результатов, полученных в процессе апробации методологии использования спектроскопии ЯМР для конформационного анализа модельных тритерпеноидов (**1**) – (**3**), основанной на полном анализе спектра ЯМР ^1H , точном определении межпротонных расстояний и вицинальных констант $^3J_{\text{H-H}}$ и сопоставлении этих данных с результатами расчетных методов молекулярного моделирования, может быть сделан вывод о том, что аналогичный подход может быть рекомендован для исследования пространственного строения и молекулярной динамики других тритерпеноидных и близких к ним полициклических изопреноидных соединений.

Экспериментальная часть

Все ЯМР эксперименты проводились на спектрометре Bruker DPX-300 с рабочими частотами для ядер ^1H и ^{13}C , соответственно, 300.13 и 75.468 МГц. Для регистрации спектров ЯМР тритерпеноидов **(1)** – **(2)** использовались растворы 10-30 мг вещества в 0.6 мл CDCl_3 , а для тритерпеноида **3** – раствор 20 мг вещества в 0.6 мл CD_3OD . Химические сдвиги измерены по отношению к ТМС путем присвоения сигналу растворителя ($\text{CDCl}_3/\text{CHCl}_3$) стандартных значений 7.26 м.д. (^1H) и 76.90 м.д. (^{13}C) с точностью не менее ± 0.01 м.д., а для растворителя ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{CD}_2\text{HOD}$) – 3.31 м.д. (^1H) и 49.05 м.д. (^{13}C), соответственно.

Использовался стандартный пакет программ импульсных последовательностей и процедур обработки данных во временном и спектральном представлении фирмы “Bruker”: “XWINNMR” и “Topspin”, а также учитывались рекомендации фирмы-изготовителя спектрометра по подготовке, проведению и обработке полученных данных для каждого из ЯМР-экспериментов.

Основные параметры регистрации полученных в работе спектров ЯМР приведены в **таблице 7**. Все эксперименты были проведены в 5-миллиметровом двухканальном датчике с внутренней стабилизацией магнитного поля по ядрам ^2H с помощью стандартных импульсных последовательностей в режиме квадратурного детектирования. При регистрации спектров ЯМР ^{13}C с развязкой от протонов использовалась импульсная последовательность WALTZ-16 [50]. Из-за отсутствия датчика с инверсной регистрацией гетероядерные эксперименты HSQC проводились без широкополосной развязки от ядер углерода-13 (HSQCnd – no decoupling) в двух режимах: с рефокусировкой противофазной когерентности и регистрацией синфазных протонных сигналов или без рефокусировки с регистрацией противофазных дублетных сигналов. Во втором случае время импульсной последовательности сокращалось в 2 раза, а последующая подстройка фазы по координате F2 не требовала больших усилий.

Во всех случаях перед Фурье-преобразованием выполнялись процедуры дополнения нулями и аподизации. При этом в зависимости от цели эксперимента применяли различные весовые функции. В экспериментах COSY-90 и DQF-COSY размер спектральной матрицы составлял 2048·512, а в экспериментах NOESY, HSQCnd2 и COLOC – 1024·512. Из функций аподизации чаще всего применялось

Лоренц-Гауссово преобразование [42], параметры которого **LB** и **GB** находились в пределе от -2.0 Гц до -4.0 Гц и от 0.2 до 0.4, соответственно.

Таблица 7

Основные параметры регистрации спектров ЯМР^{*)}

№	Название эксперимента	P1, мкс	P3, мкс	SW1, м.д.	SW2, м.д.	D1, с	AQ, с	NS	TD
1	¹ H	10	-	8	-	2.2	3.41	32	16k
2	¹ H{ ¹ H} ^{**)}	11	-	8	-	2.2	3.41	128	16k
3	¹³ C	9.6	-	220	-	2.0	0.5	1к	16k
4	DEPT	11	9.6	100	-	1.5		1к	16k
5	J-COSY	11	-	3.4	0.15	2.2	1.0	8	2048·120
6	COSY-90	10	-	3 – 6	3 – 6	2.2	1.14	8	2048·256
7	DQF-COSY	10	-	3 – 6	3 – 6	2.2	1.14	64	2048·256
8	NOESY	11	-	6	6	2.2 ^{****)}	0.29	128	1024·256
9	HSQCnd2	11	9.6	4	80	2.0	0.43	240	1024·160
10	COLOC ^{***)}	11	9.6	6.4	200	2.0	0.34	256	1024·128
11	HOESY	9.6	9.6	40	3	2.0	0.34	512	2048·100

^{*)} – P1 и P3 - длительности 90°-х импульсов, соответственно по первому и второму каналам; SW1 и SW2 – спектральная ширина первого и второго измерения двумерных спектров; D1 - релаксационная задержка; AQ – время выборки данных; NS - число повторений эксперимента при накоплении сигнала; TD – количество точек, использованных для оцифровки сигнала;

^{**)} – мощность радиочастотного поля по второму каналу при гомоядерном селективном эксперименте PL24 \approx 50 Дб;

^{***)} – регистрация гетероядерного спектра COLOC проводилась с оптимизацией на константу J_{C-H} = 8 Гц;

^{****)} – релаксационная задержка D1 в серии спектров NOESY для измерения скорости кросс-релаксации вариировалась так, чтобы сумма D1 + τ_m + AQ оставалась неизменной.

Для расчетов молекулярной структуры молекул тритерпеноидов методами молекулярного моделирования [51] использовался пакет программ “HyperChem”, версия 5.1, а также пакет программ “ChemOffice”, версия 12.0. Расчетные значения вицинальных констант получены с помощью графической программы “MestRe-J” [52]. Для проведения полного отнесения сигналов во всех спектрах использовалась программы “MestReC” (версия 4.7) и “MestReNova” (версия 12.0). Построение графиков проводились с помощью программы “OriginPro” (версии 9.2), а для подготовки рисунков использовалась стандартная компьютерная программа “Paint”.

Благодарности

Выражаю искреннюю благодарность всем, кто помогал в процессе данной работы: научному руководителю Станиславу Ивановичу Селиванову; научному консультанту доценту кафедры химии природных соединений Алле Дмитриевне Зориной за синтез исследованных тритерпеноидов и обсуждение полученных результатов ЯМР исследований, а также сотрудникам ресурсного центра СПбГУ «Магнитно-резонансные методы исследования» за обеспечение проведения ЯМР экспериментов.

Список литературы

1. Braun S., Kalinowski H.-O., Berger S. 150 and More Basic NMR Experiments. A Practical Course. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH, 1998. 595 p.
2. Kumar A. Two-dimensional nuclear Overhauser effect experiment in a protein: the first NOESY (1979-80) // *Magn. Reson. Chem.* 2003. Vol. 41, № S1. P. S26–S32.
3. Neuhaus D., Williamson M.P. The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis. 2nd ed. London: John Wiley & Sons, 2000. 619 p.
4. Köck M., Griesinger C. FAST NOESY Experiments—An Approach for Fast Structure Determination // *Angew. Chemie Int. Ed. English.* 1994. Vol. 33, № 3. P. 332–334.
5. Geppert T., Köck M., Reggelin M., Griesinger C. Fast NOESY for Micromolecules without Compromise in Distance Accuracy // *J. Magn. Reson.* 1995. Vol. 107, № 1. P. 91–93.
6. Bodenhausen G., Ruben D. J. Natural abundance N-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy // *Chem. Phys. Lett.* 1980. Vol. 69. P. 185–189.
7. Kessler H., Griesinger C., Zarbock J., Loosli H. R. Assignment of carbonyl carbons and sequence analysis in peptides by heteronuclear shift correlation via small coupling constants with broadband decoupling in t1 (COLOC) // *J. Magn. Reson.* 1984. Vol. 57, № 2. P. 331–336.
8. Köver K. E., Batta G. The Role of Mixing Time in 2D Heteronuclear NOE Experiments // *J. Magn. Reson.* 1986. Vol. 69, № 3. P. 344–349.
9. Nagayama K., Bachmann P., Wüthrich K., Ernst R. R. The Use of Cross-Sections and Projections in Two-dimensional NMR Spectroscopy // *J. Magn. Reson.* 1978. Vol. 31, № 1. P. 133–148.
10. Rance M., Sørensen, O.W., Bodenhausen, G., Wagner, G., Ernst, R.R., Wüthrich, K. Improved spectral resolution in COSY ¹H NMR spectra of proteins via double quantum filtering // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983. Vol. 117, № 2. P. 479–485.
11. Derome A. E., Williamson M. P. Rapid-Pulsing Artifacts in Double-Quantum-Filtered COSY // *J. Magn. Reson.* 1990. Vol. 88, № 1. P. 177–185.
12. Pauli G. F., Gödecke T., Jaki B. U., Lankin D. C. Quantitative ¹H NMR. Development and Potential of an Analytical Method: An Update // *J. Nat. Prod.*, 2012. Vol. 75. P. 834–851.
13. Holzgrabe U., Deubner R., Schollmayer C. W.B. Quantitative NMR spectroscopy—Applications in drug analysis // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005. Vol. 38. P. 806–812.
14. Liu X., Kolpak M. X., Wu. J., Leo G. C. Automatic Analysis of Quantitative NMR Data of Pharmaceutical Compound Libraries // *Anal. Chem.* 2012. Vol. 84, № 15. P. 6914–6918.
15. Cicero D.O., Barbato G., Bazzo R. NMR Analysis of Molecular Flexibility in Solution: A New Method for the Study of Complex Distributions of Rapidly Exchanging Conformations. Application to a 13-Residue Peptide with an 8-Residue Loop // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. Vol. 117, № 3. P. 1027–1033.
16. Kolmer A., Edwards L. J., Kuprov I., Thiele C. M. Conformational analysis of small organic molecules using NOE and RDC data: A discussion of strychnine and α -methylene- γ -butyrolactone // *J. Magn. Reson.* 2015. Vol. 261. P. 101–109.

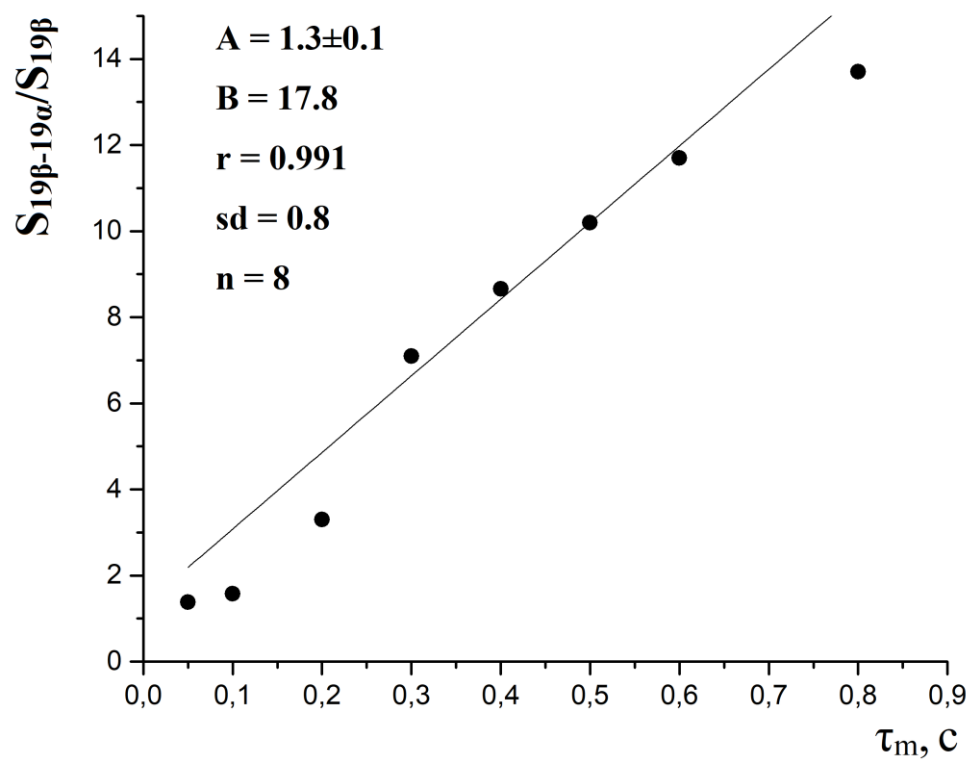
17. Macura S., Farmer B.T. (II), Brown L. R. An improved method for the determination of cross-relaxation rates from NOE data // *J. Magn. Reson.* 1986. Vol. 70, № 3. P. 493–499.
18. Elyashberg M., Williams A.J., Blinov K. Structural revisions of natural products by Computer-Assisted Structure Elucidation (CASE) systems // *Nat. Prod. Rep.* 2010. Vol. 27, № 9. P. 1296.
19. Gu, C. Z., Lv, J. J., Zhang, X. X., Qiao, Y. J., Yan, H., Li, Y., Wang, D., Zhu, H. T., Luo, H.-R., Yang, C. R., Xu, M., Zhang, Y. J. Triterpenoids with Promoting Effects on the Differentiation of PC12 Cells from the Steamed Roots of *Panax notoginseng* // *J. Nat. Prod.* 2015. Vol. 78, № 8. P. 1829–1840.
20. Yodsaoue, O., Sonprasit, J., Karalai, C., Ponglimanont, C., Tewtrakul, S., Chantrapromma, S. Diterpenoids and triterpenoids with potential anti-inflammatory activity from the leaves of *Aglaia odorata* // *Phytochemistry*. Elsevier Ltd, 2012. Vol. 76. P. 83–91.
21. Huifeng Li, Ye Min, Guo Hongzhu, Tian Yin, Zhang Jie, Zhou Jianping, Hu Yuchi, Guo Dean. Biotransformation of 20(S)-protopanaxadiol by *Mucor spinosus* // *Phytochemistry*. Elsevier Ltd, 2009. Vol. 70, № 11–12. P. 1416–1420.
22. Ky, P. T., Huong, P. T., My, T. K., Anh, P. T., Kiem, P. V., Minh, V. C., Cuong, N. X., Thao, N. P., Nhiem, N. X., Hyun, J. H., Kang, H. K., Kim Y.H. Dammarane-type saponins from *Gynostemma pentaphyllum* // *Phytochemistry*. Elsevier Ltd, 2010. Vol. 71, № 8–9. P. 994–1001.
23. Zhou Qi-Le, Yang Xiu-Wei. Four new ginsenosides from red ginseng with inhibitory activity on melanogenesis in melanoma cells // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* Elsevier Ltd, 2015. Vol. 25, № 16. P. 3112–3116.
24. Zhang, Q., Jiang, Z. Y., Luo, J., Liu, Ji. F., Ma, Y. B., Guo, R. H., Zhang, X. M., Zhou, J., Chen J.J. Anti-HBV agents. Part 2: Synthesis and in vitro anti-hepatitis B virus activities of alisol A derivatives // *Bioorganic Med. Chem. Lett.* Elsevier Ltd, 2009. Vol. 19, № 8. P. 2148–2153.
25. Akihisa, T., Toduka, H., Ukiya, M., Suzuki, T., Enjo, F., Koike, K., Nikaido, T., Nishino H. 3-Epicabraleahydroxylactone and Other Triterpenoids from *Camellia* Oil and Their Inhibitory Effects on Epstein–Barr Virus Activation // *Chem. Pharm Bull.* 2004. Vol. 52, № 1. P. 153–156.
26. Gossan, D. P. A., Magid, A. A., Yao-Kouassi, P. A., Coffy, A. A., Josse, J., Gangloff, S. C., Morjani, H., Voutquenne-Nazabadioko L. Triterpene glycosides from the aerial parts of *Gouania longipetala* // *Phytochemistry*. 2017. Vol. 134. P. 71–77.
27. Ukiya, M., Kikuchi, T., Tokuda, H., Tabata, K., Kimura, Y., Arai, T., Ezaki, Y., Oseto, O., Suzuki, T., Akihisa, T. Antitumor-promoting effects and cytotoxic activities of dammar resin triterpenoids and their derivatives // *Chem. Biodivers.* 2010. Vol. 7, № 8. P. 1871–1884.
28. Aiken, C., Chen C.H. Betulinic acid derivatives as HIV-1 antivirals // *Trends Mol. Med.* 2005. Vol. 11, № 1. P. 31–36.
29. Каледина А.С., Зорина А.Д., Зарубаев В.В., Анохина В.В., Эрхитуева Е.Б. Т.П.Е. Синтез и свойства 2-цианоэтоксипроизводных даммаровых тритерпеноидов // *ЖОрХ.* 2015. Vol. 51, № 11. P. 1656–1661.
30. Serkova N.J., Brown M.S. Quantitative analysis in magnetic resonance spectroscopy: from metabolic profiling to in vivo biomarkers. // *Bioanalysis.* 2012. Vol. 4, № 3. P. 321–341.

31. Эрнст Р., Боденхаузен Дж., Вокаун А. ЯМР в одном и двух измерениях / ed. Салихова К.М. Москва: Мир, 1990. 711 p.
32. Дероум Э. Современные методы ЯМР для химических исследований / ed. Устынюка Ю.А. Москва: Мир, 1992. 403 p.
33. Agrawal, P. K., Jain D.C. ^{13}C NMR spectroscopy of oleanane triterpenoids // *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 1992. Vol. 24, № 1. P. 1–90.
34. Sousa, G. F., Duarte, L. P., Alcântara, A. F.C., Silva, G. D.F., Vieira-Filho, S. A., Silva, R. R., Oliveira, D. M., Takahashi, J. A. New triterpenes from maytenus robusta: Structural elucidation based on NMR experimental data and theoretical calculations // *Molecules*. 2012. Vol. 17, № 11. P. 13439–13456.
35. Baleja J.D., Moulton J., Sykes B.D. Distance measurement and structure refinement with NOE data // *J. Magn. Reson.* 1990. Vol. 87, № 2. P. 375–384.
36. Bremer J., Mendz G.L., Moore W.J. Skewed Exchange Spectroscopy. Two-Dimensional Method for the Measurement of Cross Relaxation in ^1H NMR Spectroscopy // *J. Am. Chem. Soc.* 1984. Vol. 106, № 17. P. 4691–4696.
37. Селиванов С. И., Шавва А. Г. Спектроскопия ЯМР в изучении пространственной структуры и внутримолекулярной динамики модифицированных аналогов стероидных гормонов // *Биоорганическая химия*. 2002. Vol. 28, № 3. P. 220–235.
38. Старова Г. Л., Селиванов С. С., Егоров М. С, Селиванов С. И., Шавва А. Г. Молекулярная структура 17 α -ацетокси-3-метокси-6-окса-D-гомо-8-изоэстра-1,3,5(10)-триена и его 4-метилпроизводного // *Кристаллография*. 2004. Vol. 49, № 3. P. 502–507.
39. Шавва А. Г., Антимонов О. И., Байгозин Д. В., Старова Г. Л., Селиванов С. И., Морозкина С. Н. Синтез и исследование молекулярной структуры D-гомо-B-нор-8 α -аналогов стероидных эстрогенов // *ЖОрХ*. 2010. Vol. 46, № 10. P. 1506–1511.
40. Karplus M. Contact Electron-Spin Coupling of Nuclear Magnetic Moments // *J. Chem. Phys.* 1959. Vol. 30, № 1. P. 11–15.
41. Haasnoot C.A.G., de Leeuw F.A.A.M., Altona C. The relationship between proton-proton NMR coupling constants and substituent electronegativities-I. An empirical generalization of the karplus equation // *Tetrahedron*. 1980. Vol. 36, № 19. P. 2783–2792.
42. Bigler P. *NMR Spectroscopy: Processing Strategies*. Weinheim: Wiley – VCH, 1997. 249 p.
43. Woessner D.E. Spin relaxation processes in a two-proton system undergoing anisotropic reorientation // *J. Chem. Phys.* 1962. Vol. 36, № 1. P. 1–4.
44. Jaeger M., Aspers R.L.E.G. Steroids and NMR // *Annual Reports on NMR Spectroscopy*. 2012. Vol. 77. 115-258 p.
45. Zorina A. D., Kaledina A. S., Motsepuro I. A., Anokhina V. V., Marchenko S. A., Selivanov S. I., Zarubaev V. V., Trifonov R. E. Synthesis and anti-influenza activity of 2-cyanoethoxy and 2-(1H-tetrazol-5-yl)ethoxy derivatives of dammarane-type triterpenoids // *Russ. J. Org. Chem.* 2017. Vol. 53, № 11. P. 1710–1716.
46. Marchenko S.A., Zorina A.D., Selivanov S. I. Complete assignment of ^1H NMR spectra and conformational analysis of some triterpenoids in solution. // In: Abstracts of 15 international school-conference “Magnetic resonance and its applications.” Saint-Petersburg, 2018. P. 90–

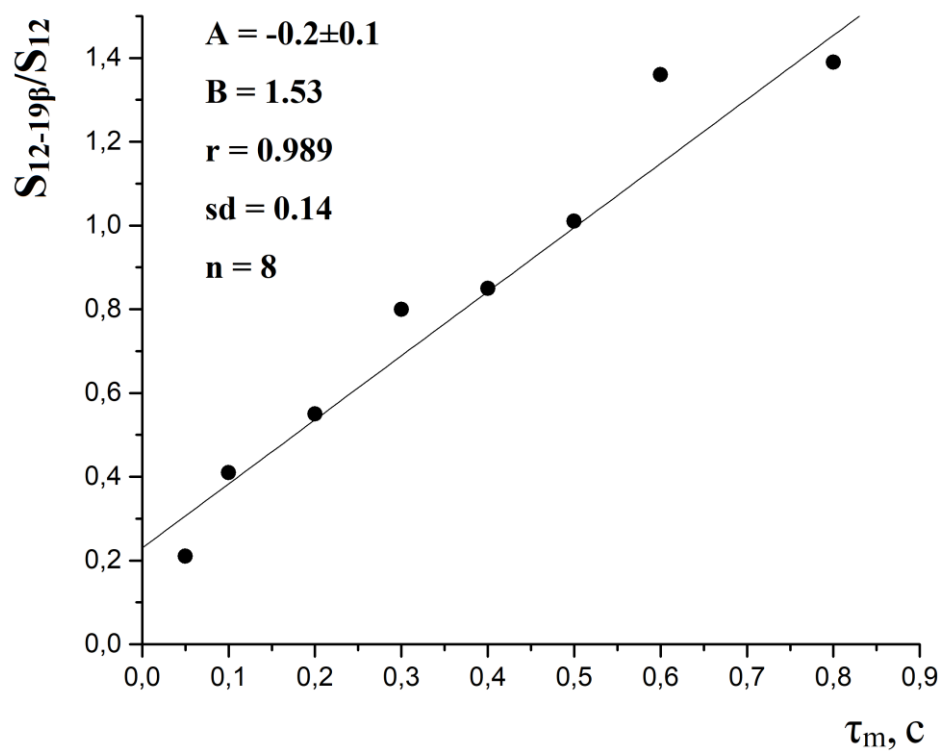
93.

47. Andersen N.H., Eaton H.L., Lai X. Quantitative small molecule NOESY. A practical guide for derivation of cross-relaxation rates and internuclear distances // *Magn. Reson. Chem.* 1989. Vol. 27, № 6. P. 515–528.
48. *Modern NMR Approaches to the Structure Elucidation of Natural Products: Volume 1: Instrumentation and Software.* 1st ed. / ed. Antony J. Williams, Gary E. Martin D.R. Royal Society of Chemistry, 2015. 329 p.
49. Butts C. P., Jones C. R., Harvey J. N. High precision NOEs as a probe for low level conformers— second conformation of strychnine // *Chem. Commun.* 2011. Vol. 47, № 4. P. 1193–1195.
50. Shaka A.J., Keeler J., Freeman R. Evaluation of a new broadband decoupling sequence: WALTZ-16 // *J. Magn. Reson.* 1983. Vol. 53, № 2. P. 313–340.
51. Weiner S. J., Kollman P. A., Case D. A., Singh Ch. U., Ghio C., Alagona G., Profeta S. Jr., Weiner P. A New Force Field for Molecular Mechanical Simulation of Nucleic Acids and Proteins // *J. Am. Chem. Soc.* 1984. Vol. 106, № 3. P. 765–784.
52. Navarro-Vazquez A., Cobas J. C., Sardina F. J., Casanueva J., Diez E. A Graphical Tool for the Prediction of Vicinal Proton-Proton $^3J_{HH}$ Coupling Constants // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 2004. Vol. 44. P. 1680–1685.

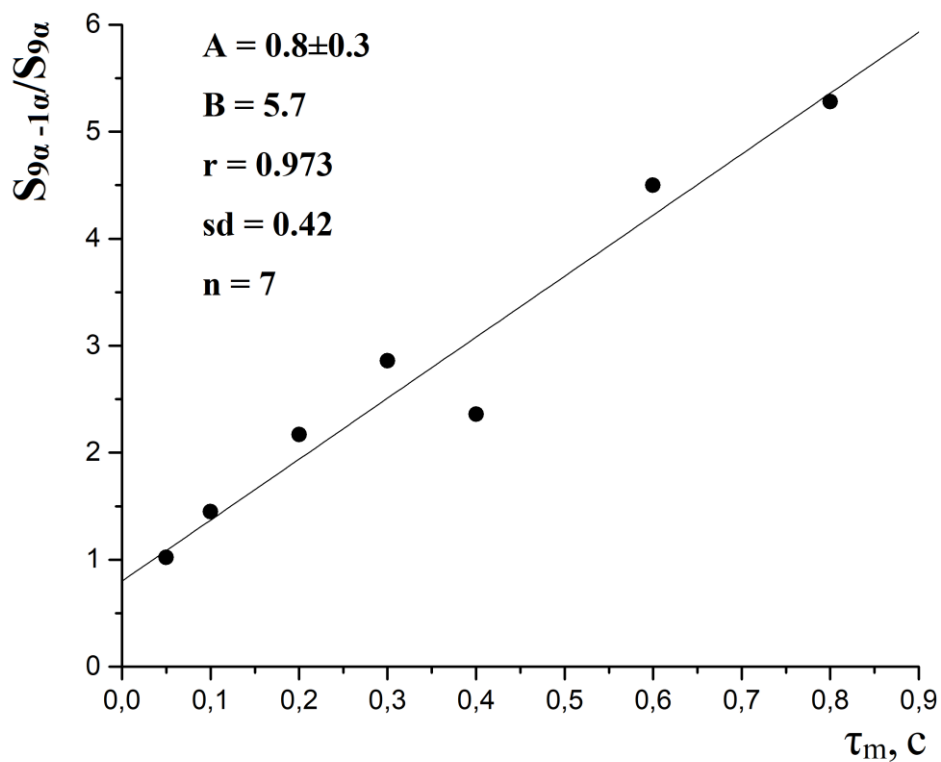
Приложения



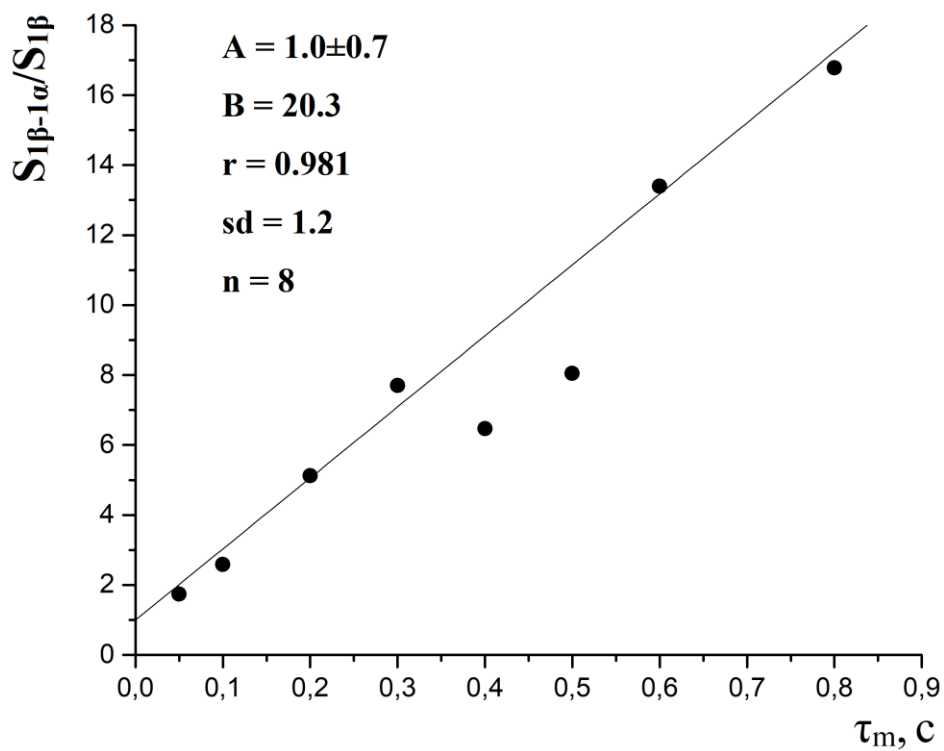
П1-1 зависимость (S_{ij}/S_{ii}) от $f(\tau_m)$ для расстояния между 19 α и 19 β протонами



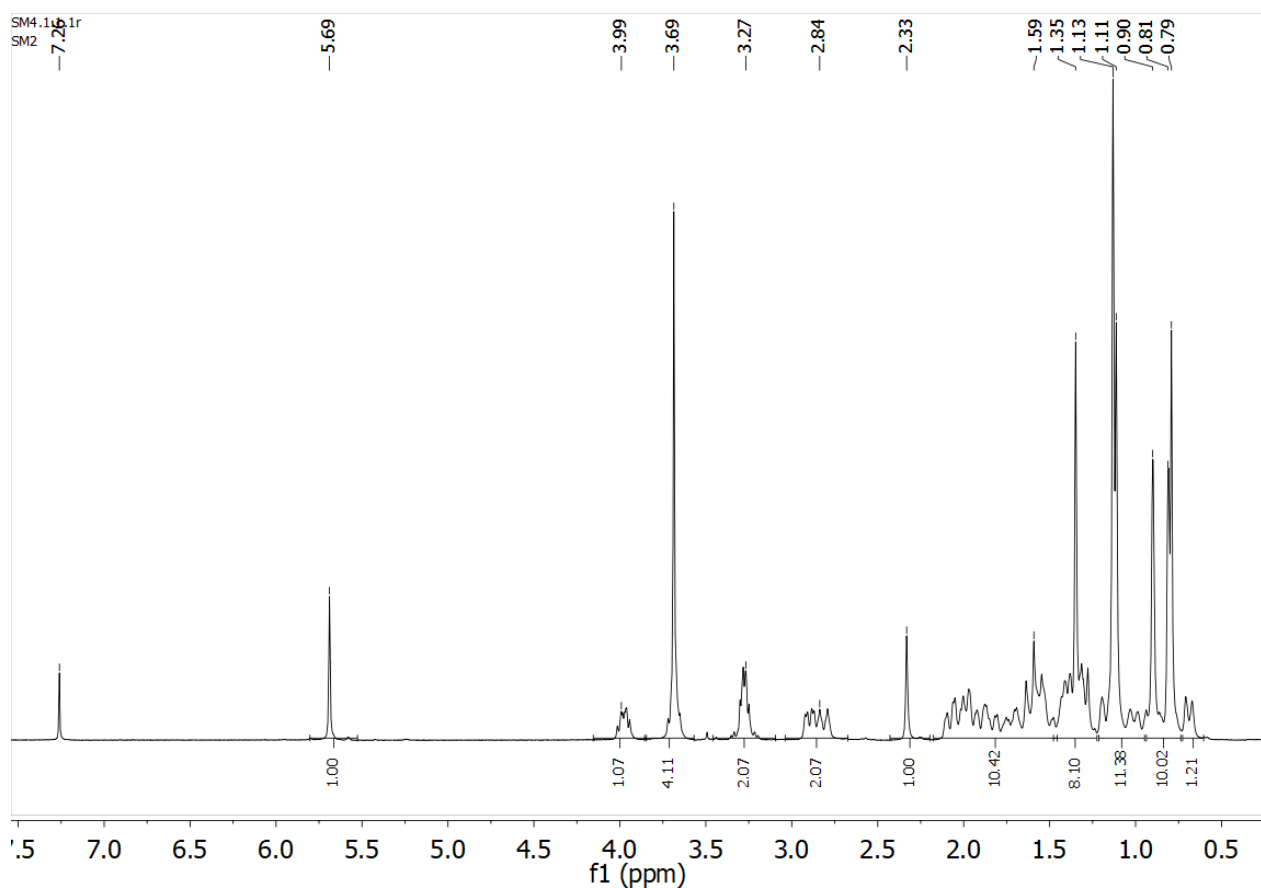
П1-2 зависимость (S_{ij}/S_{ii}) от $f(\tau_m)$ для расстояния между 12 и 19 β протонами



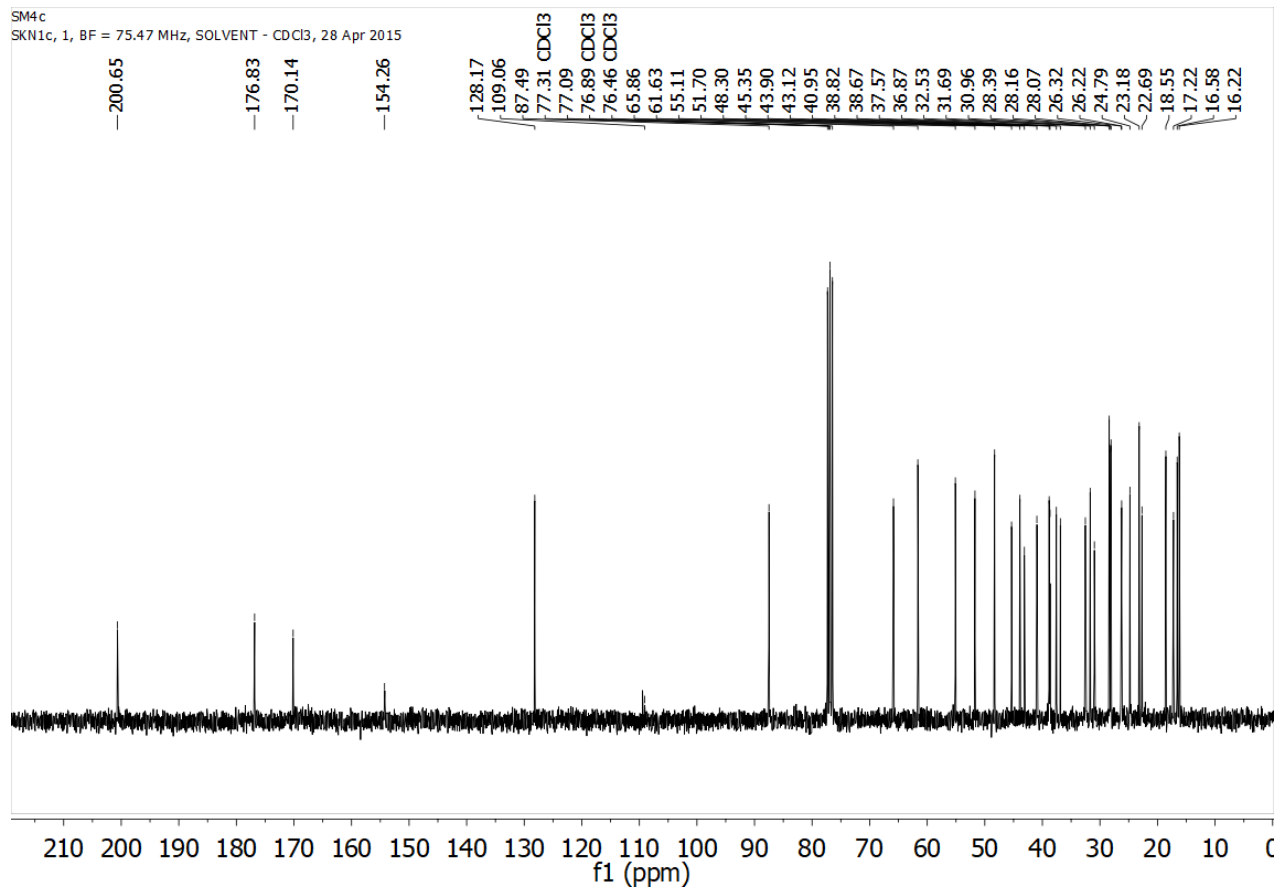
П1-3 зависимость (S_{ij}/S_{ii}) от $f(\tau_m)$ для расстояния между 9α и 1α протонами



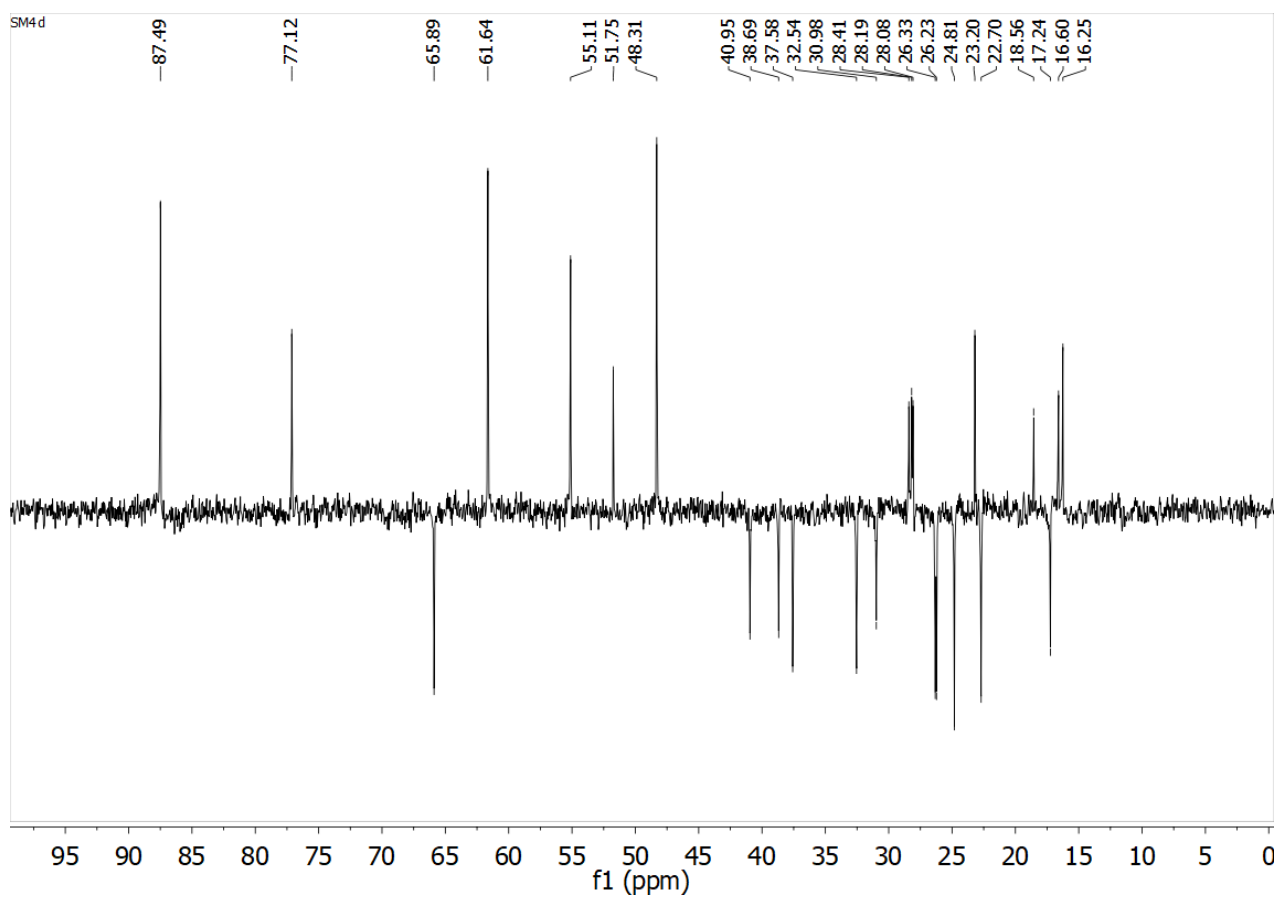
П1-4 зависимость (S_{ij}/S_{ii}) от $f(\tau_m)$ для расстояния между 1β и 1α протонами



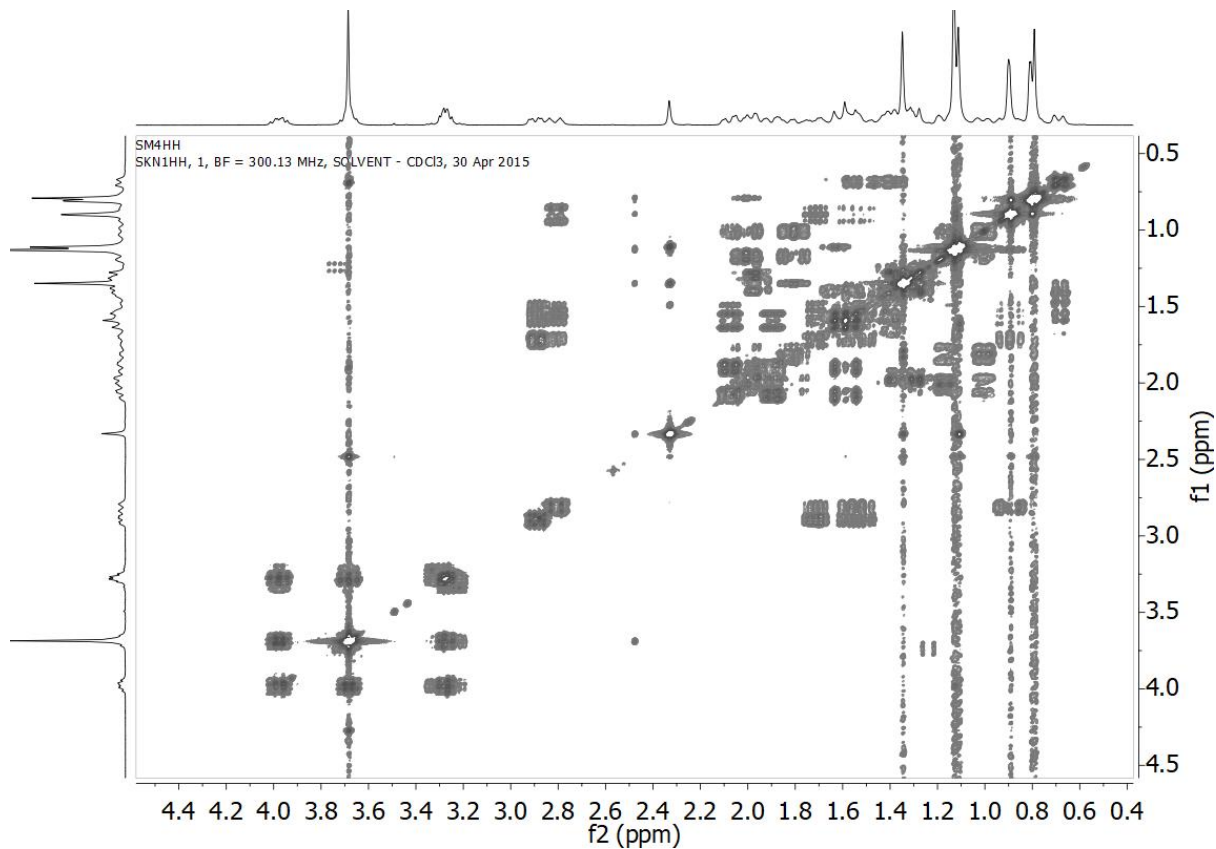
П2-1 Спектр ЯМР ^1H тритерпеноида (**1a**)



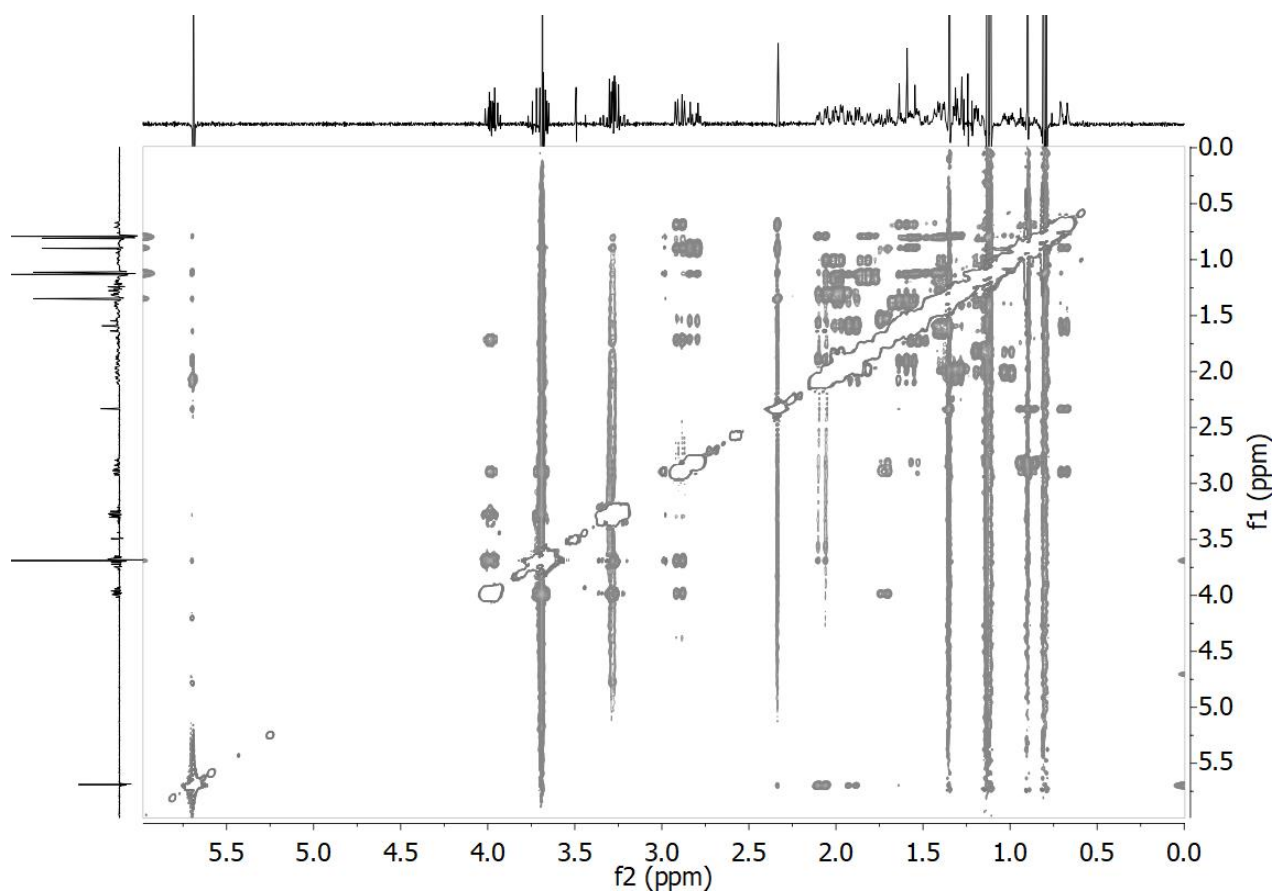
П2-2 Спектр ЯМР ^{13}C тритерпеноида (**1a**)



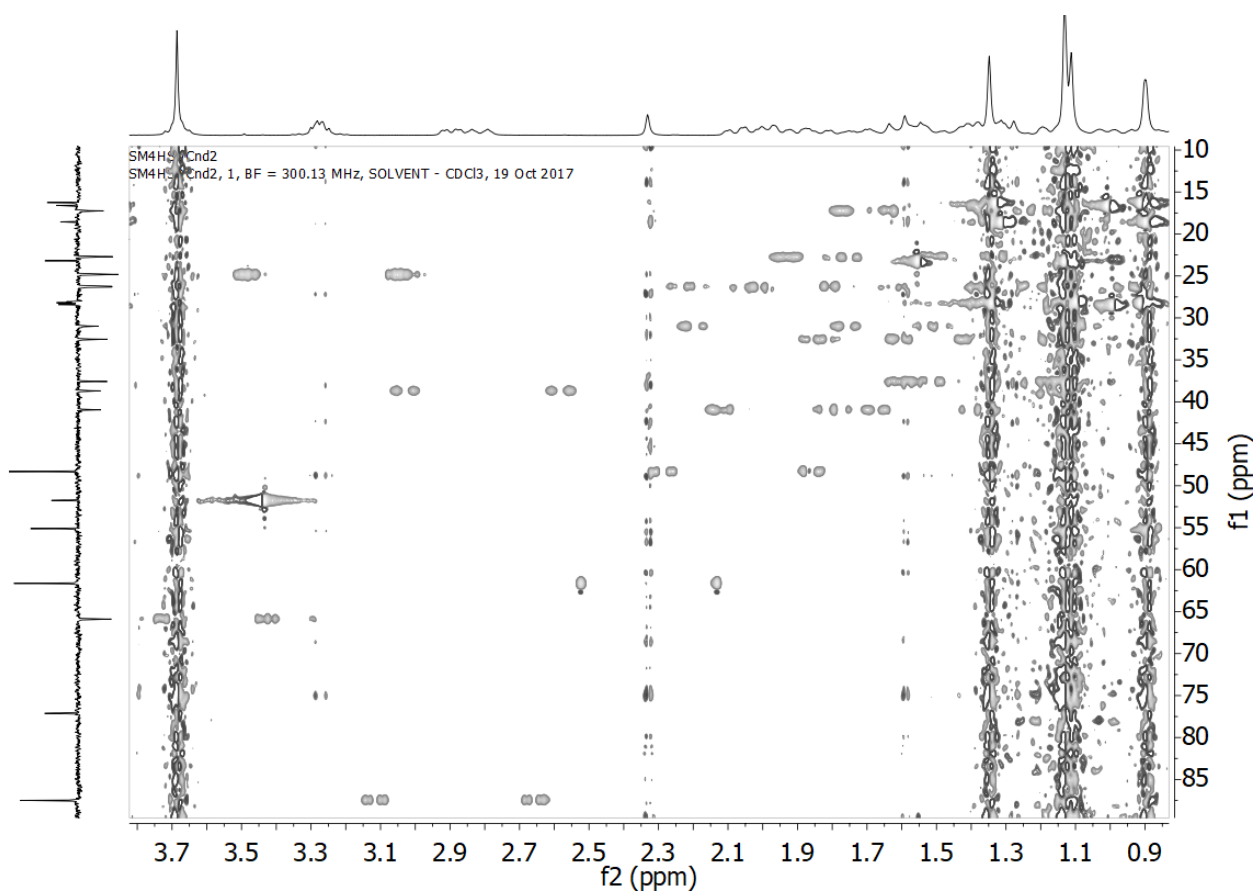
П2-3 DEPT-135 тритерпеноида (1a)



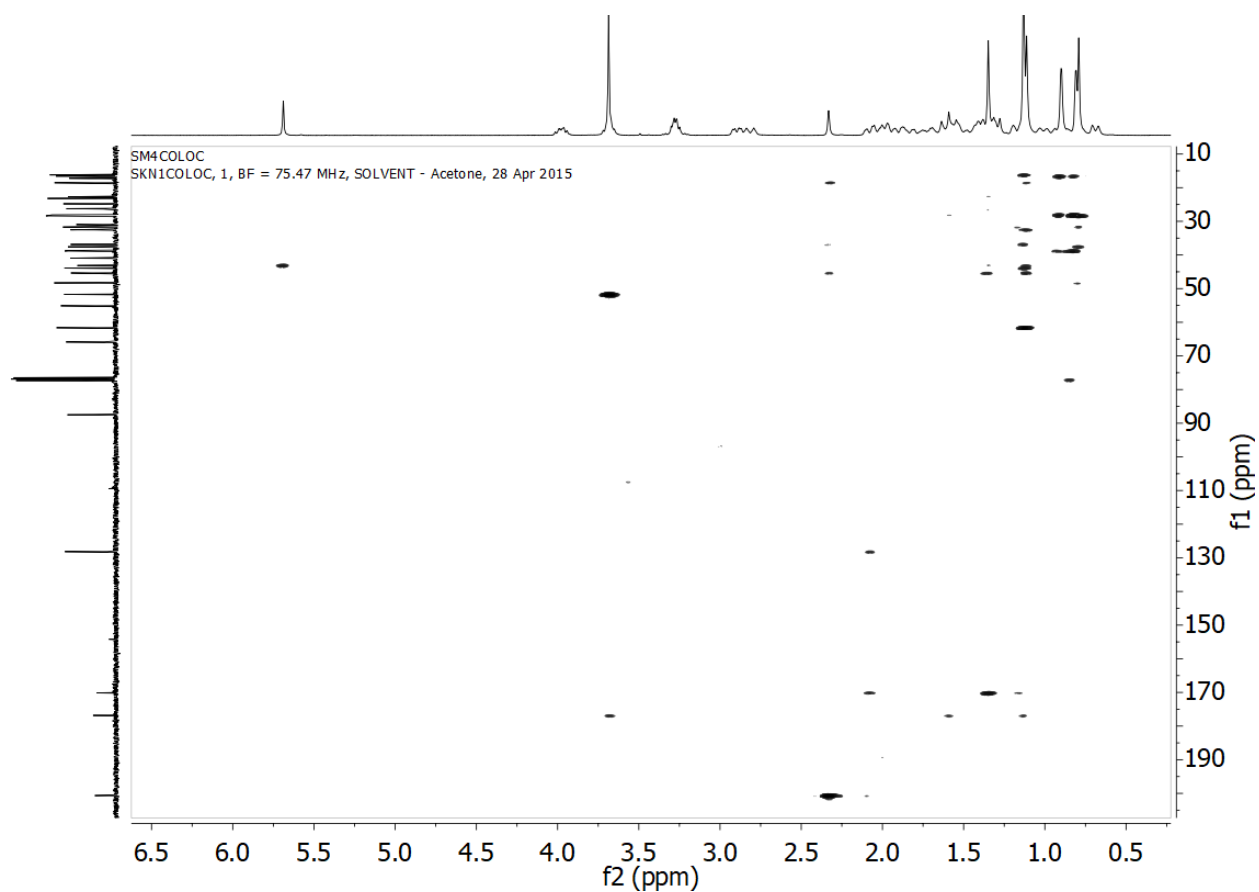
П2-4 Спектр COSY-90 тритерпеноида (1a)



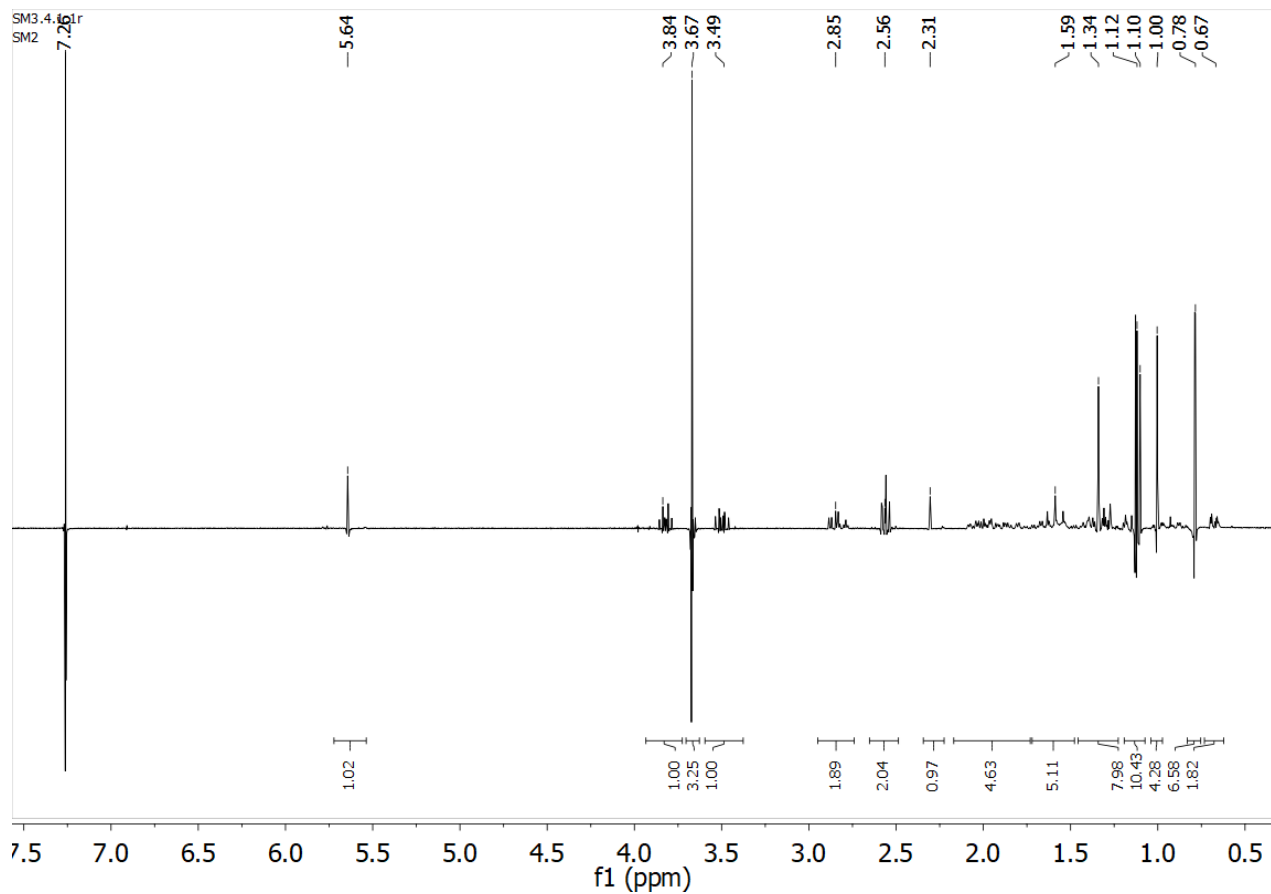
П2-5 Спектр NOESY тритерпеноида (1a)



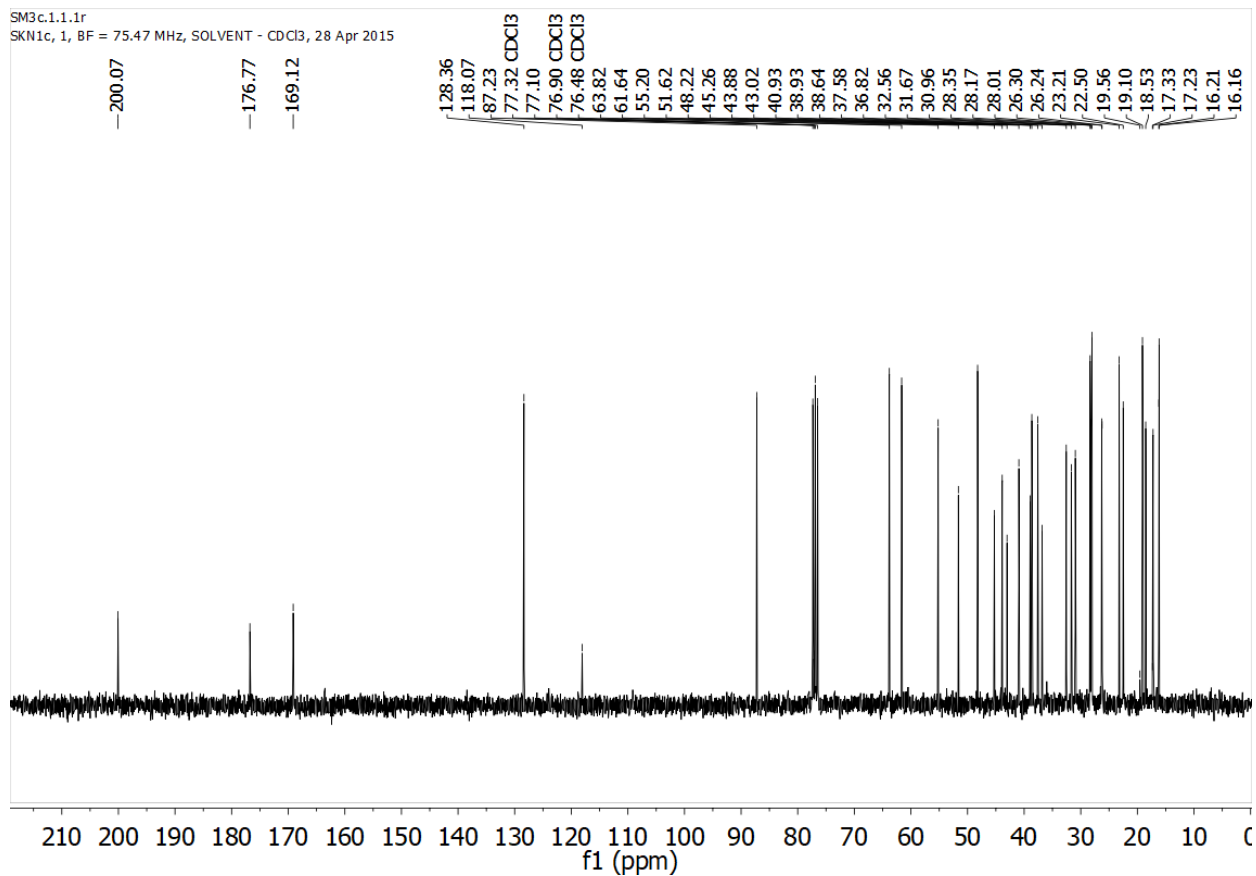
П2-6 Спектр ^1H - ^{13}C HSQCnd тритерпеноида (1a)



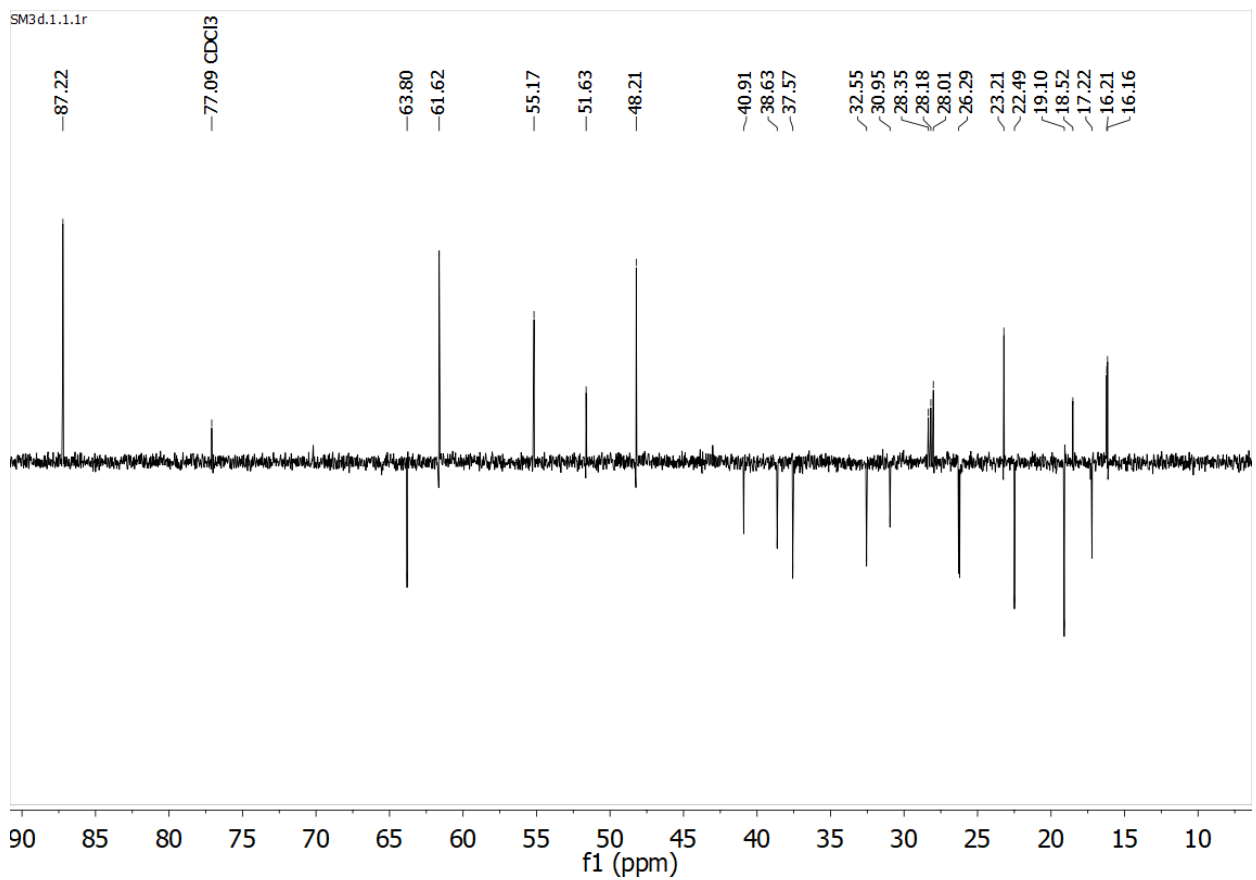
П2-7 Спектр ^1H - ^{13}C COLOC тритерпеноида (**1a**)



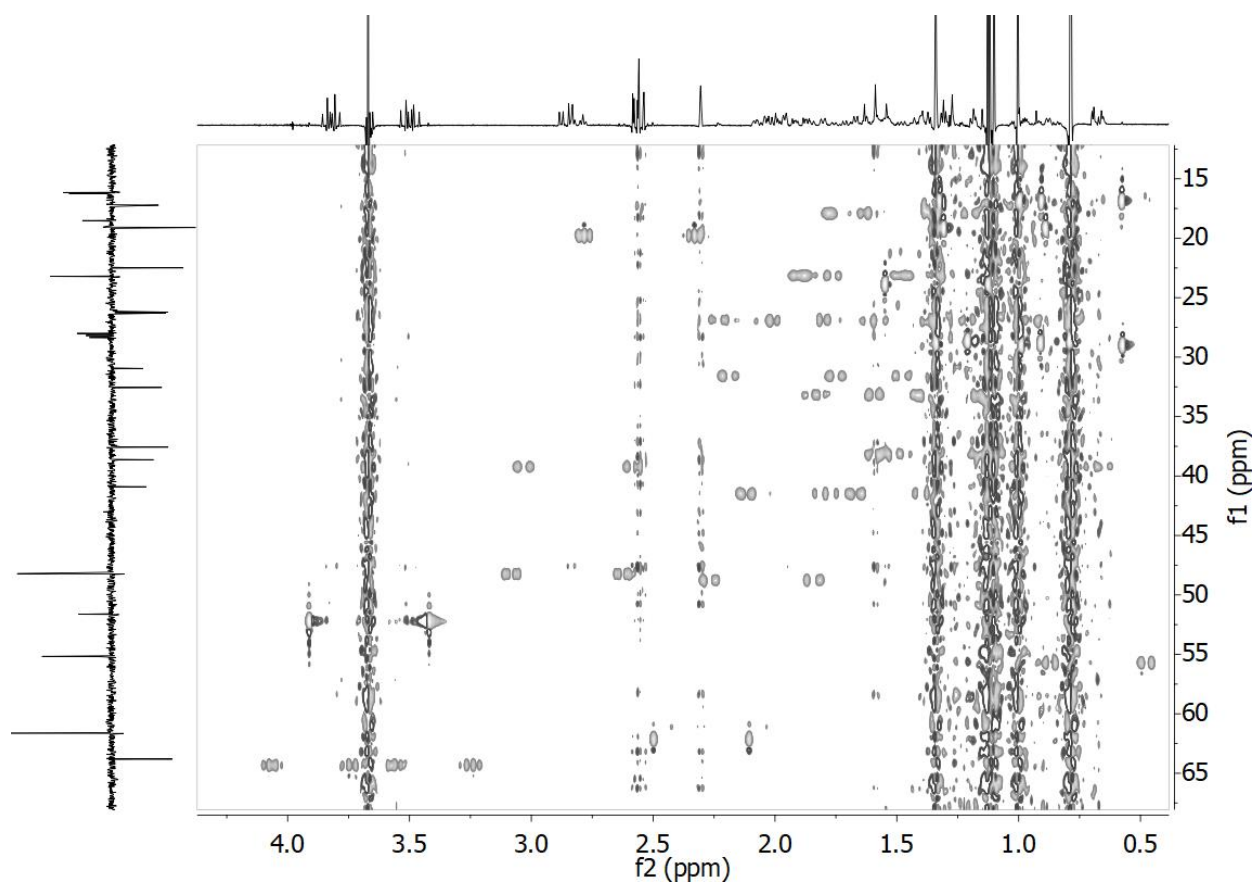
П2-8 Спектр ЯМР ^1H тритерпеноида (**16**)



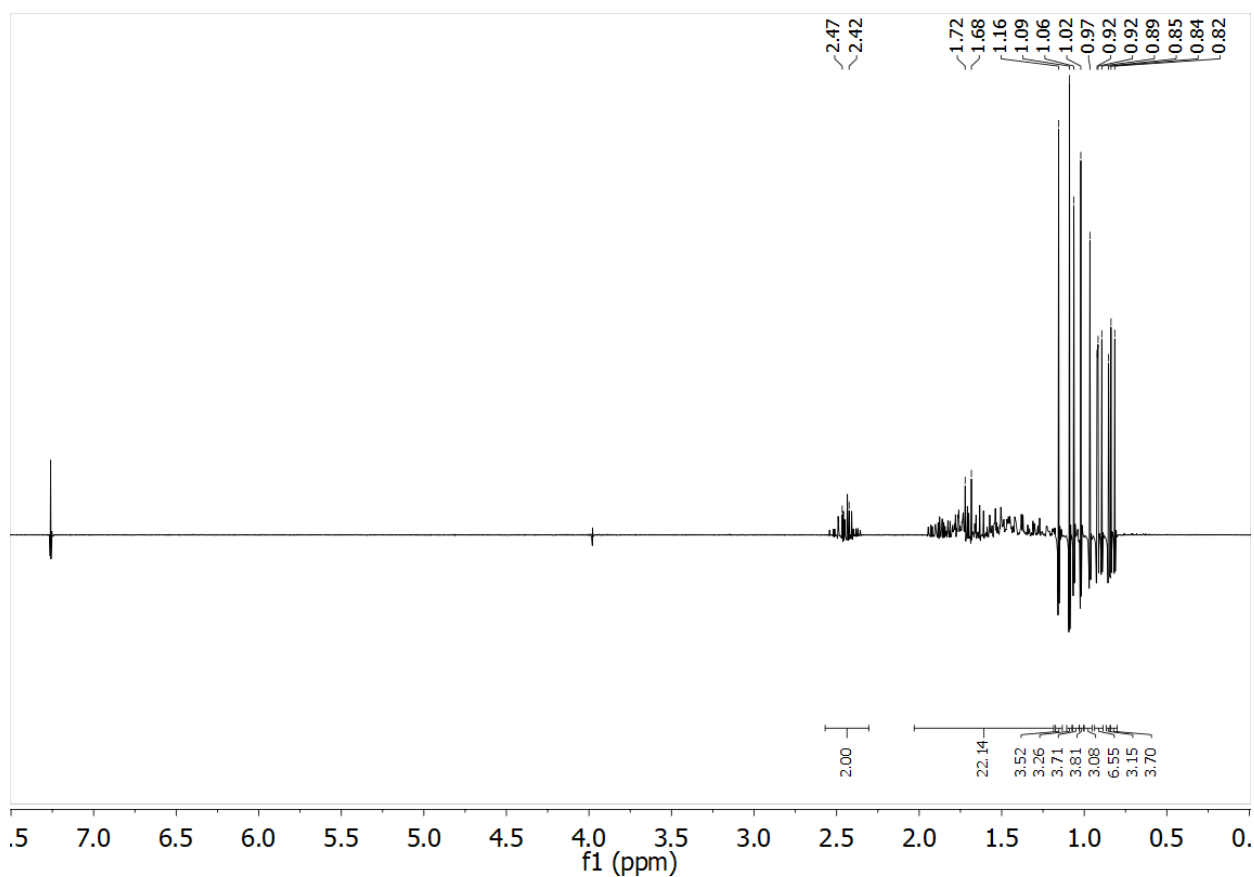
П2-9 Спектр ЯМР ¹³C тритерпеноида (16)



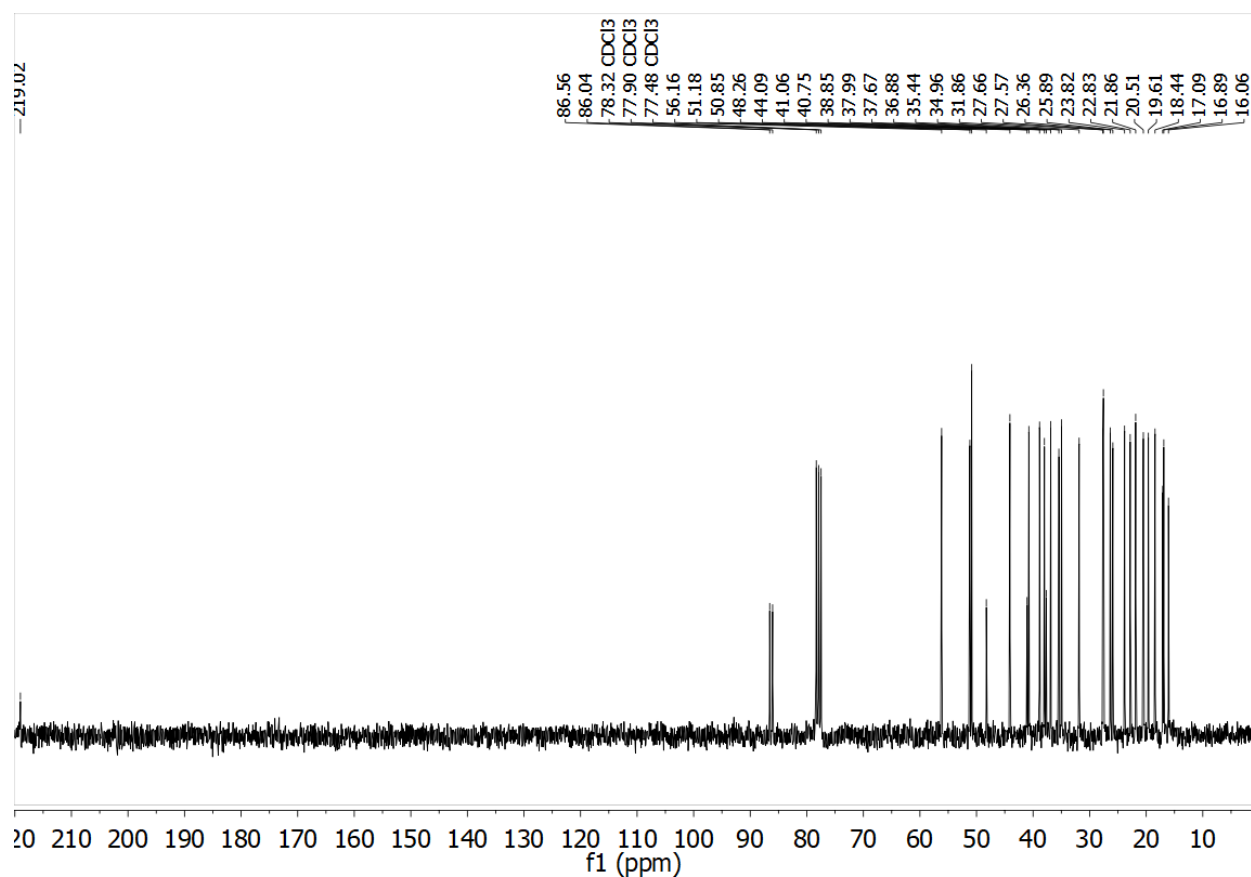
П2-10 Спектр DEPT-135 тритерпеноида (16)



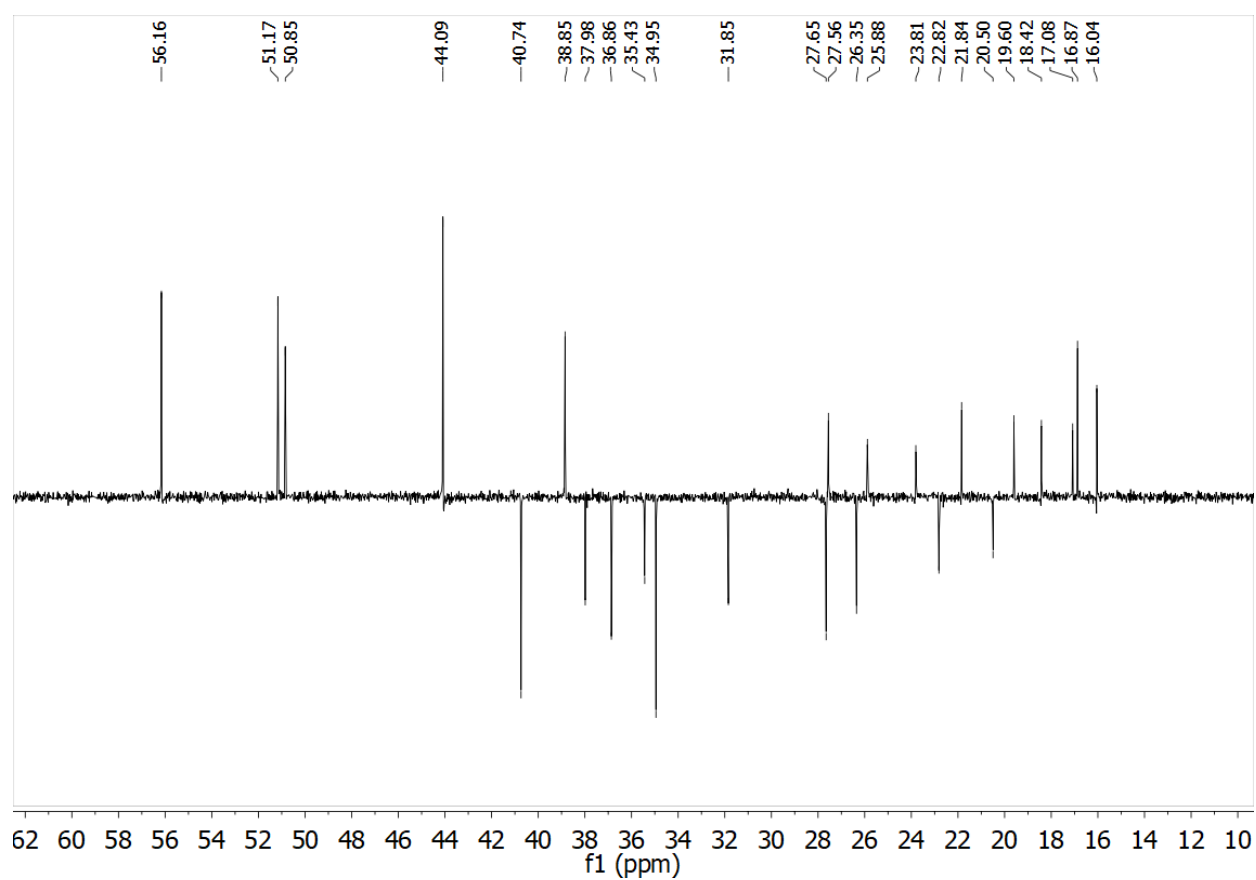
П2-13 Спектр ^1H - ^{13}C HSQCnd тритерпеноида (16)



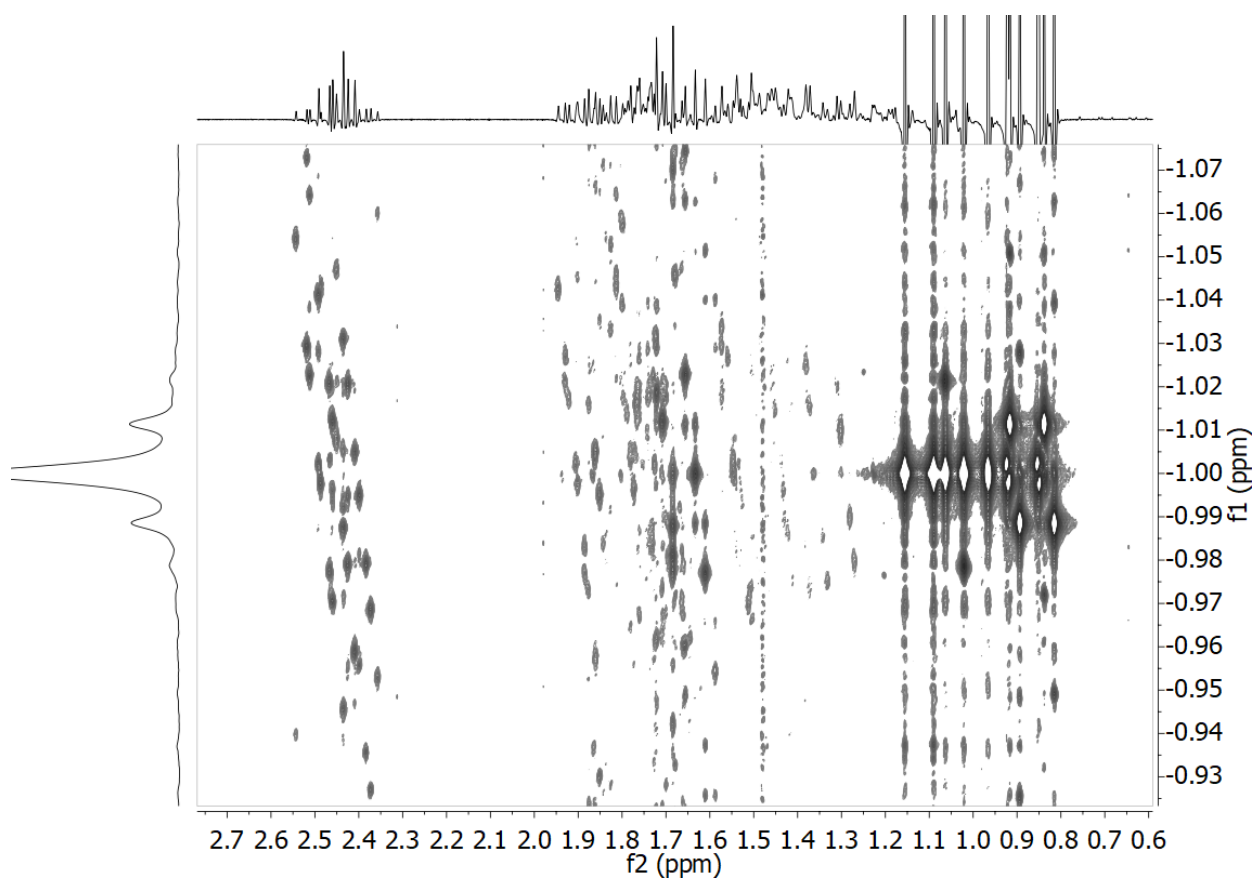
П2-14 Спектр ЯМР ^1H тритерпеноида (2a)



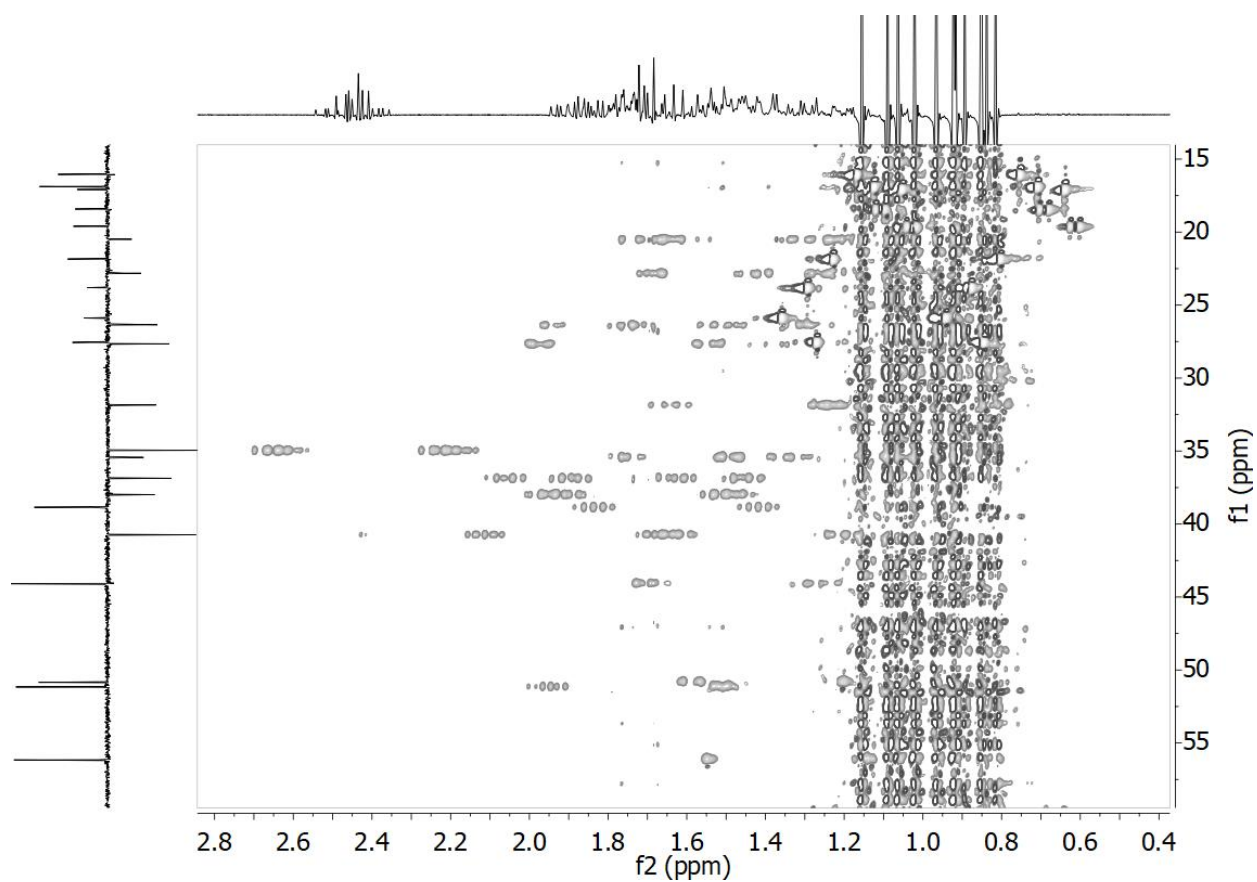
П2-15 Спектр ЯМР ^{13}C тритерпеноида (2а)



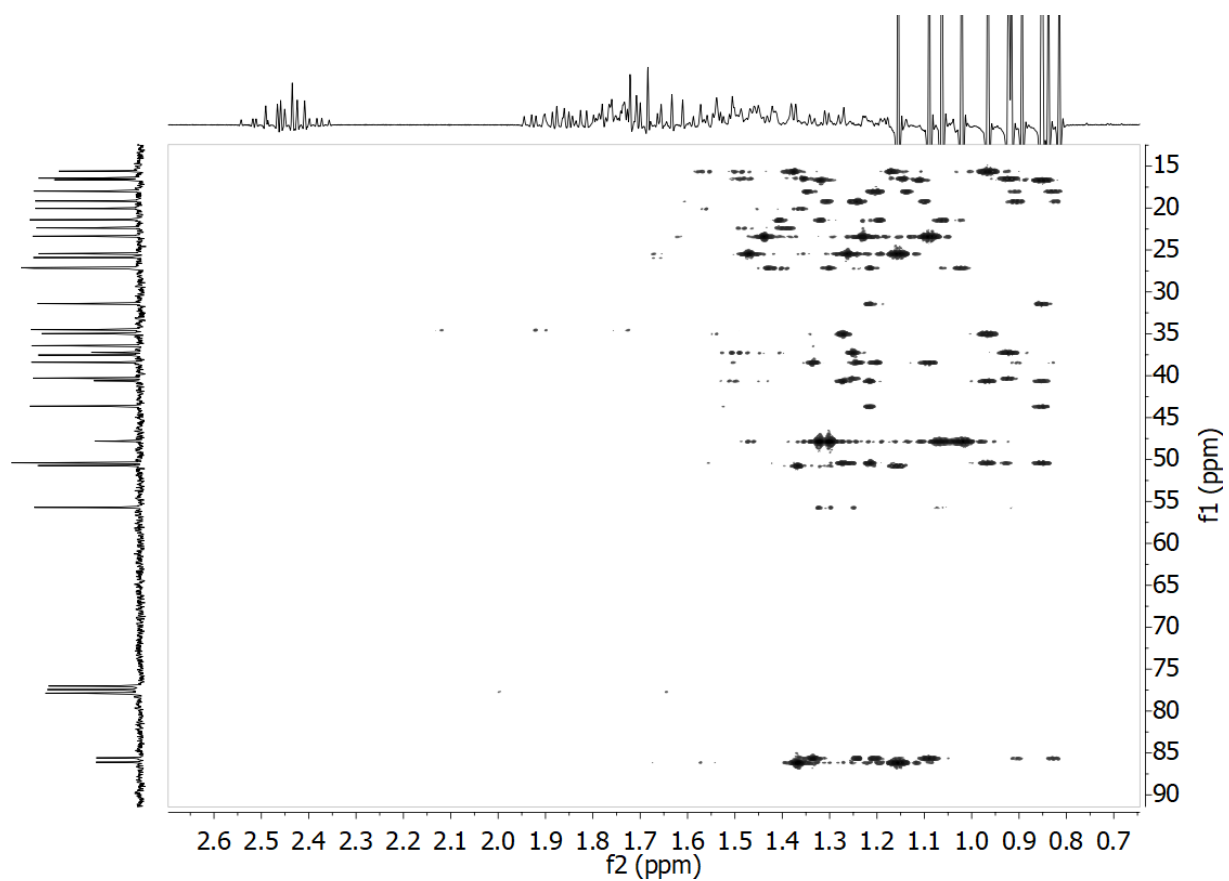
П2-16 Спектр DEPT-135 тритерпеноида (2а)



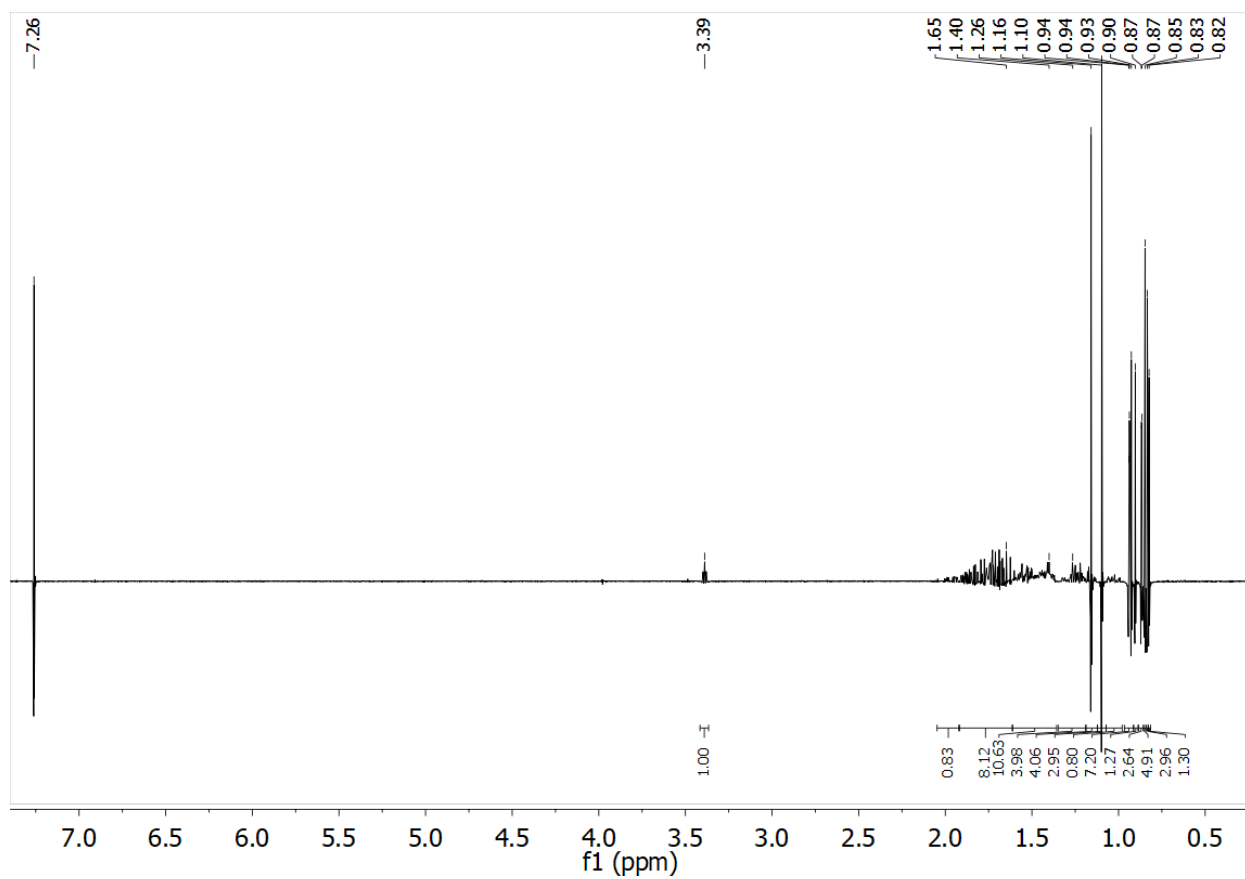
П2-19 Спектр J-COSY тритерпеноида (**2a**)



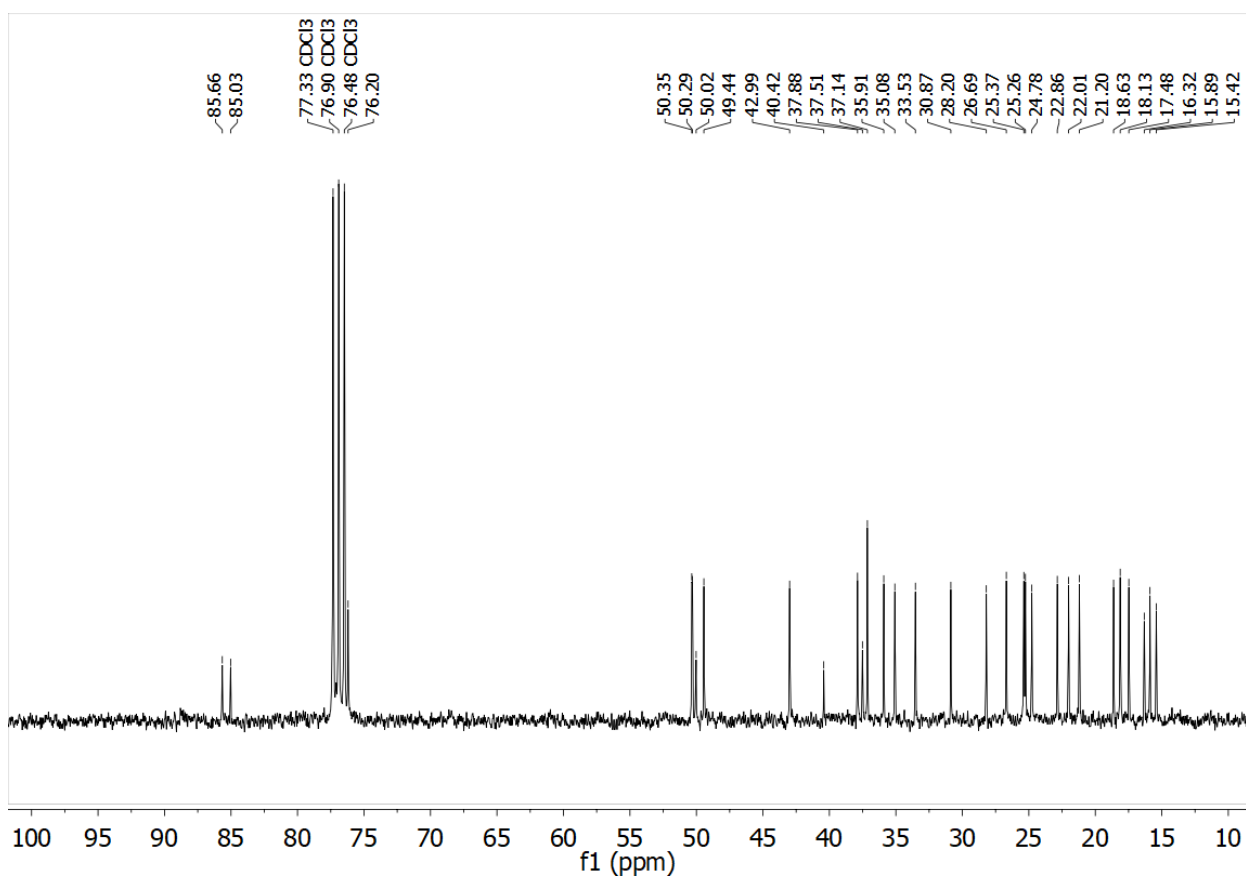
П2-20 Спектр ^1H - ^{13}C HSQCnd тритерпеноида (**2a**)



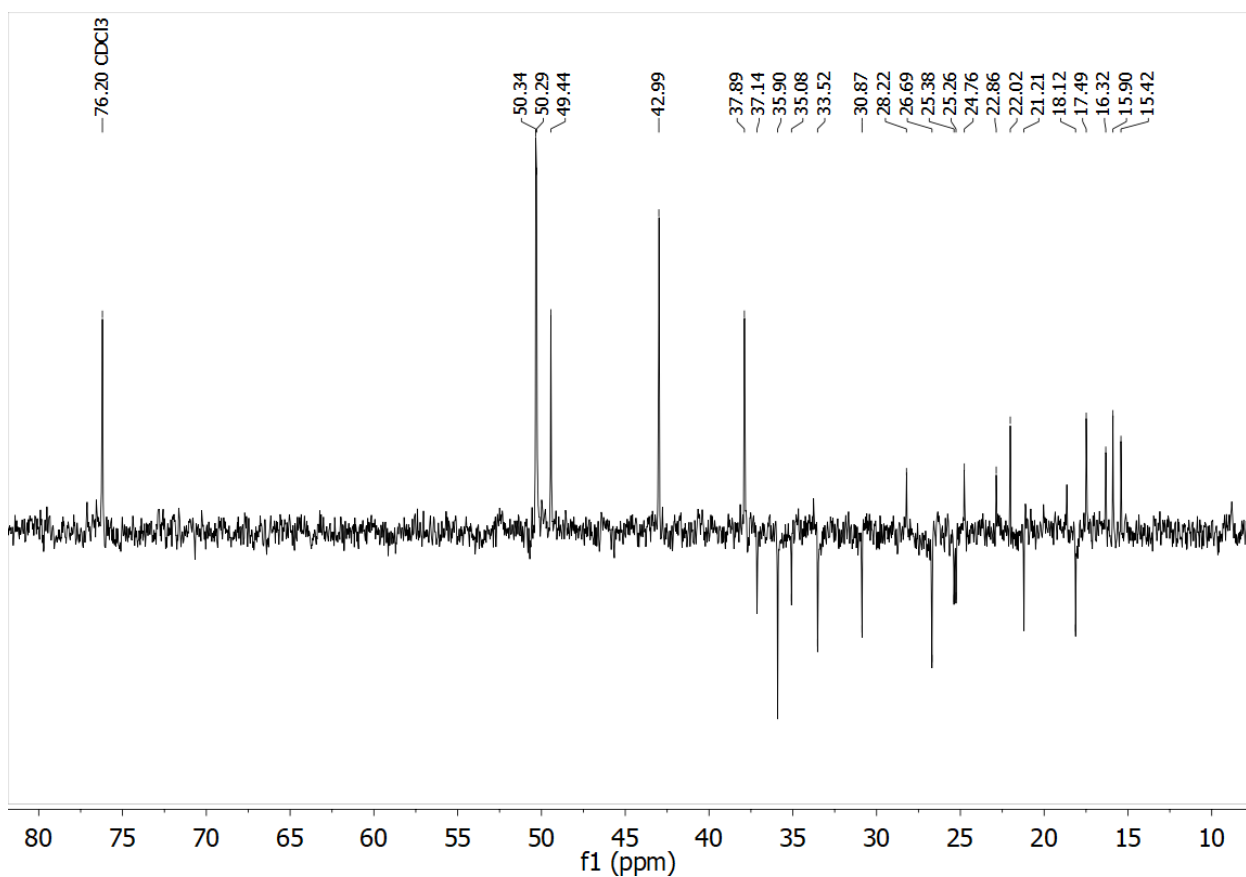
П2-21 Спектр ^1H - ^{13}C COLOC тритерпеноида (**2a**)



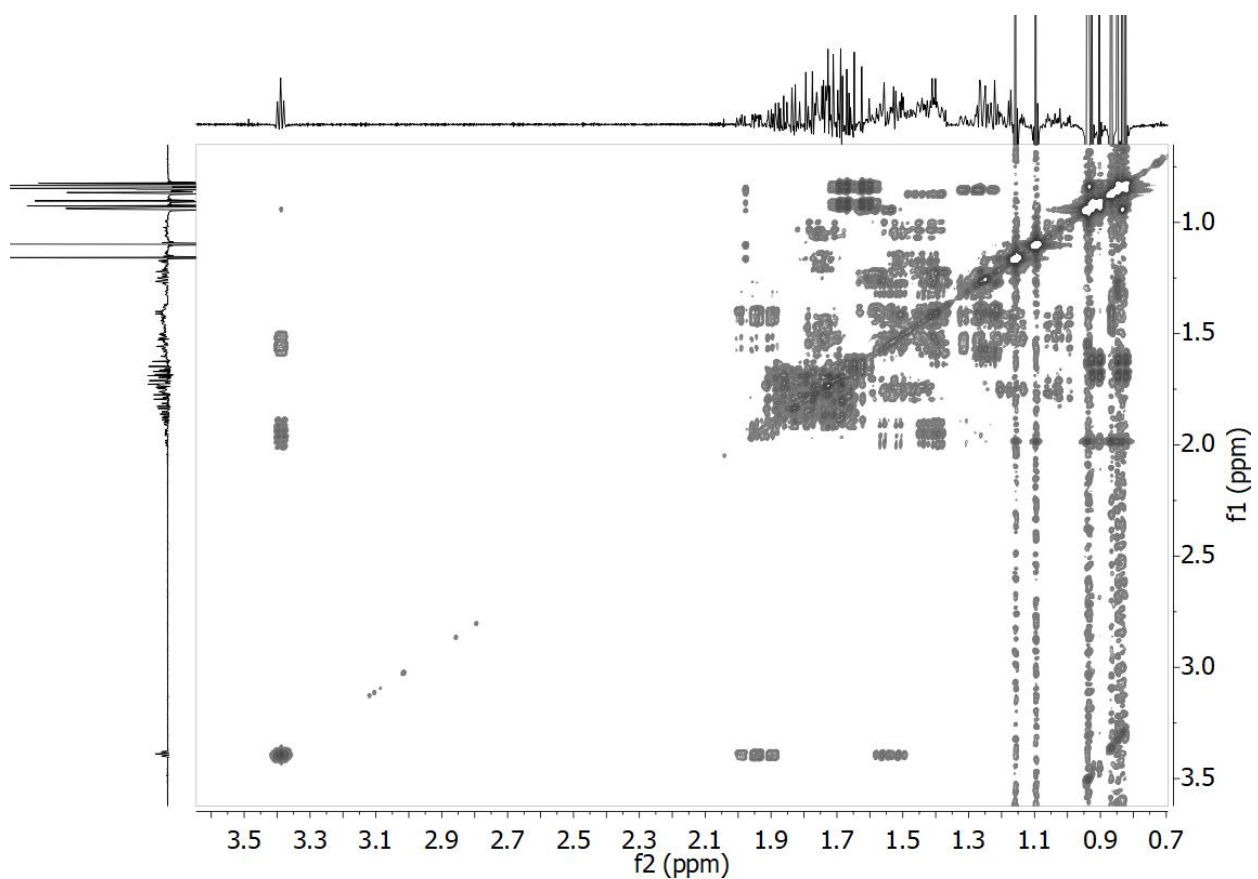
П2-22 Спектр ЯМР ^1H тритерпеноида (**26**)



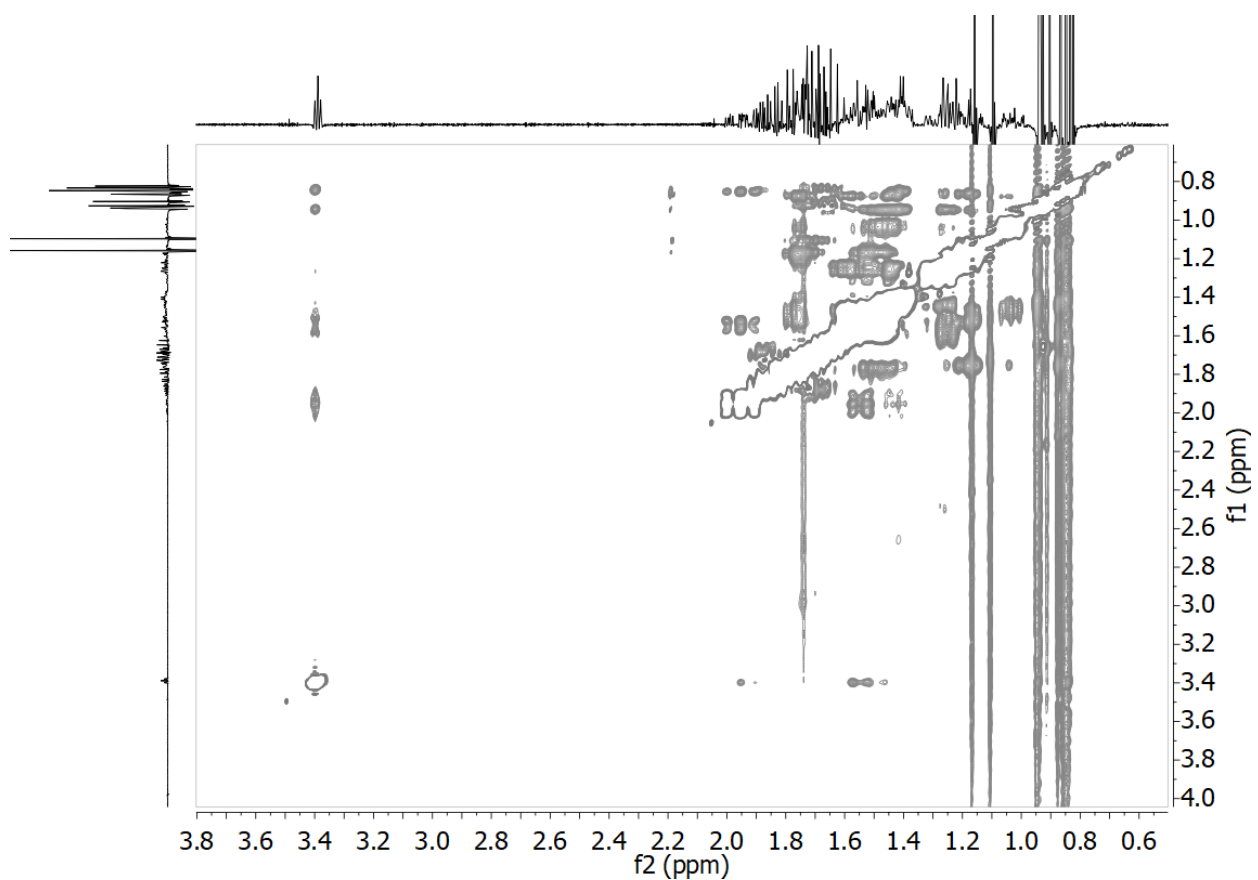
П2-23 Спектр ЯМР ¹³С тритерпеноида (26)



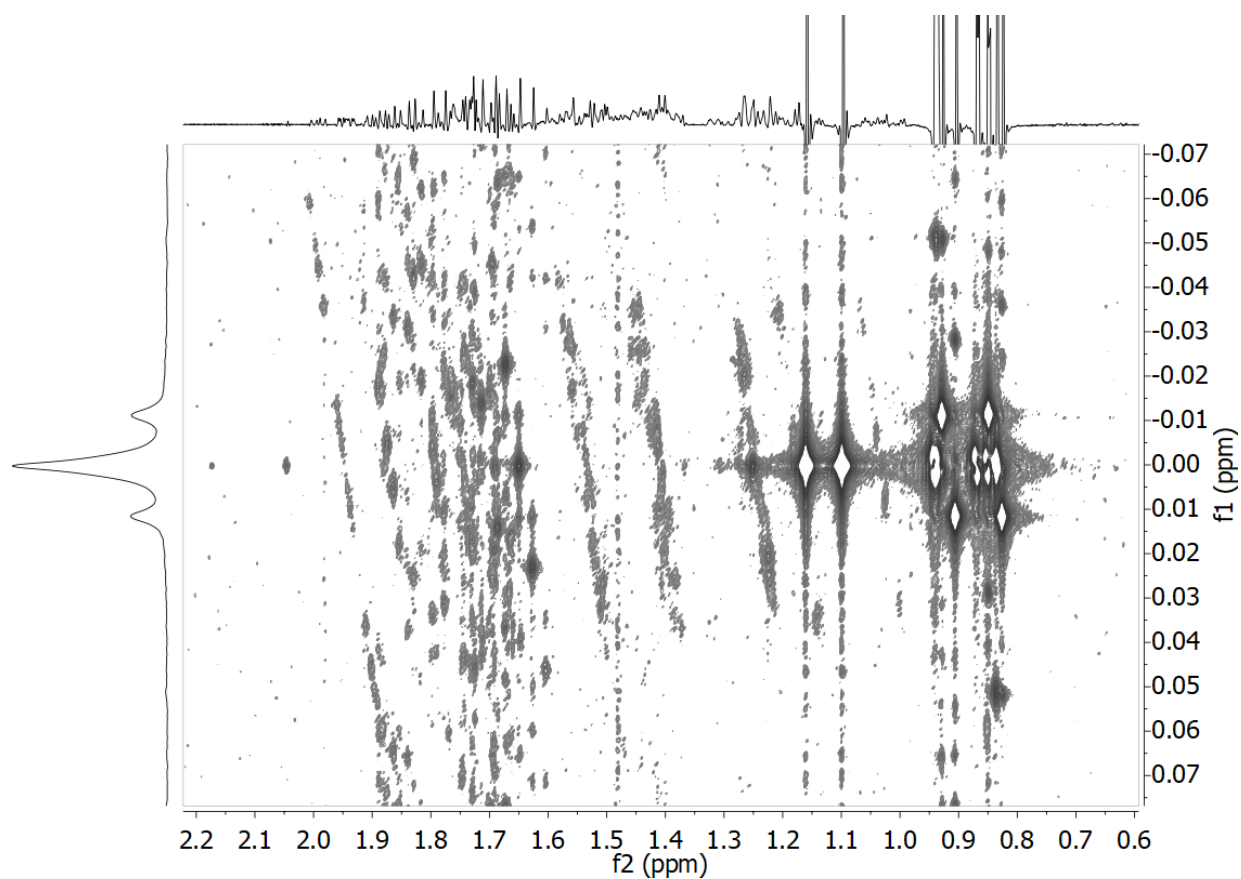
П2-24 Спектр DEPT-135 тритерпеноида (26)



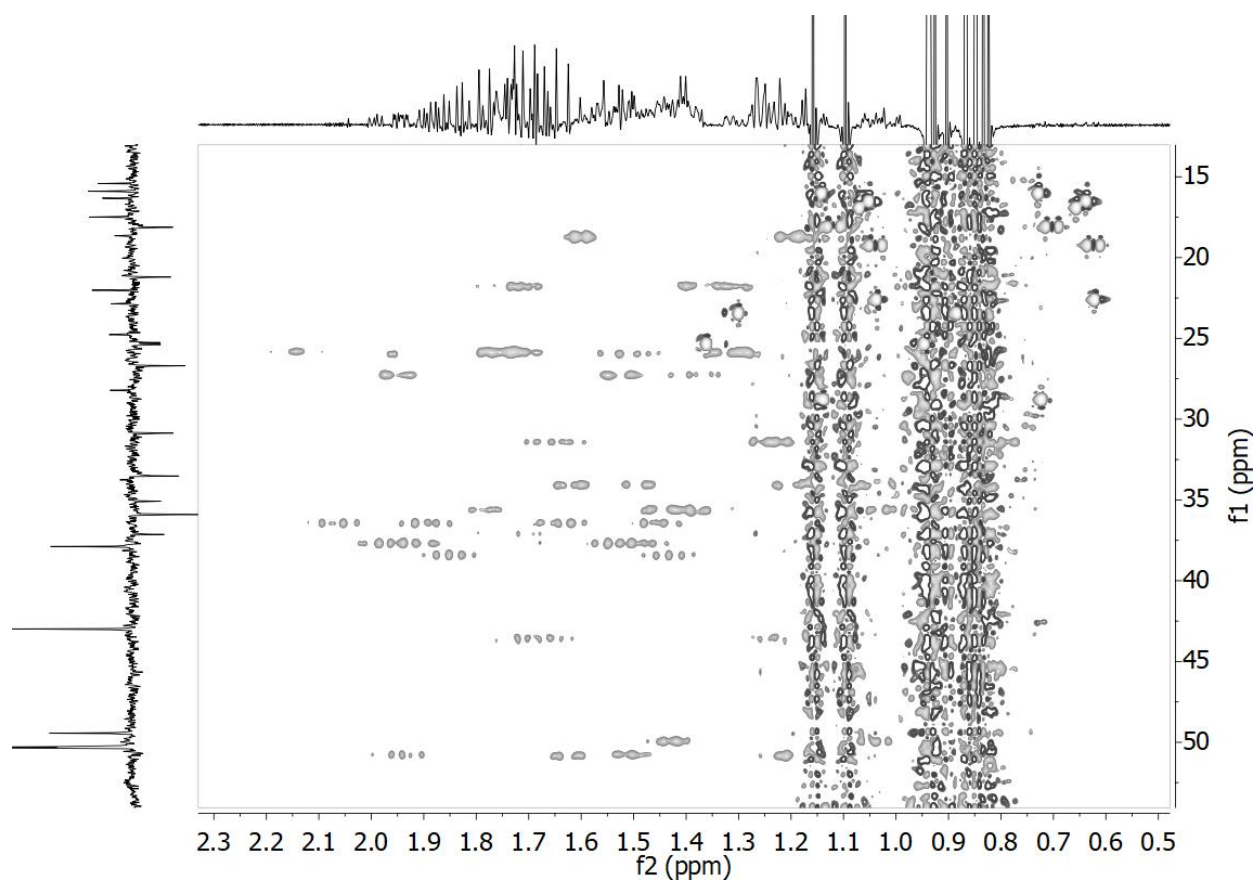
П2-25 Спектр COSY-90 тритерпеноида (**26**)



П2-26 Спектр NOESY тритерпеноида (**26**)

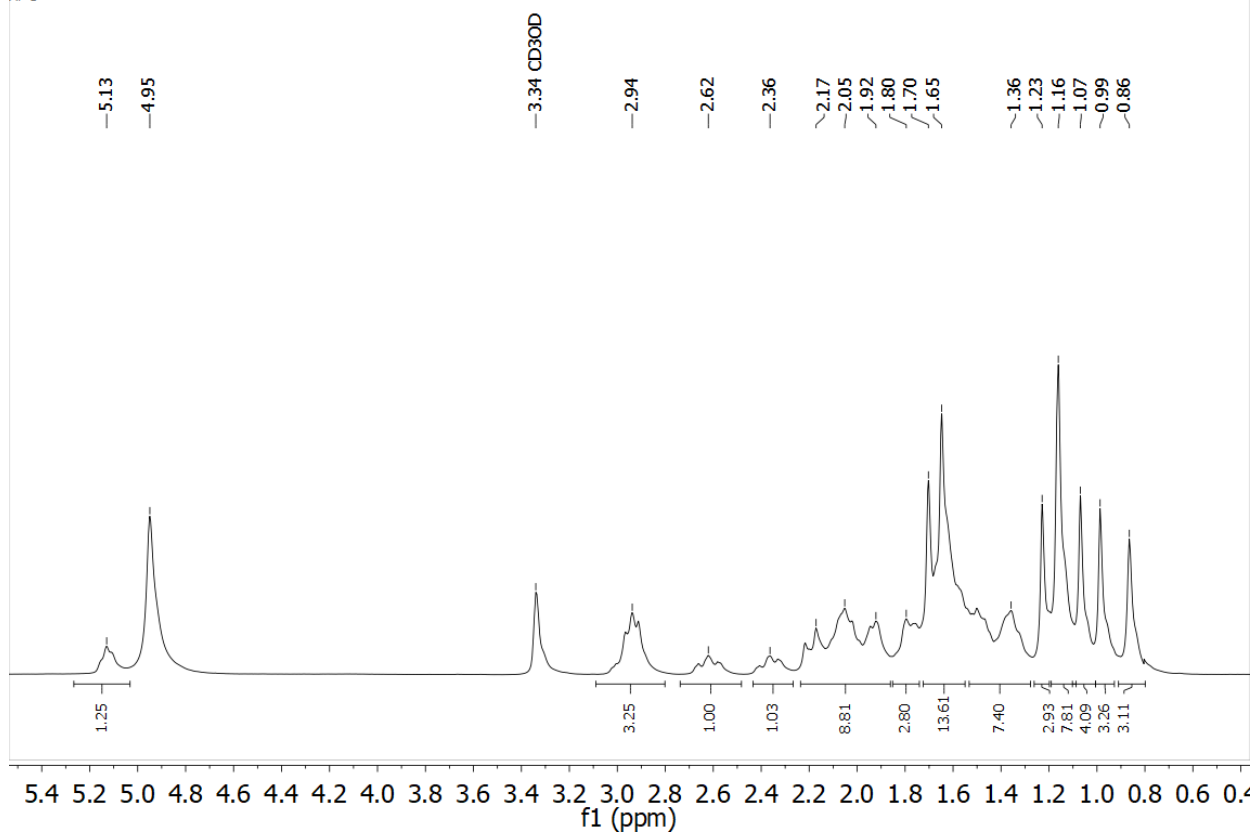


П2-27 Спектр J-COSY тритерпеноида (**26**)

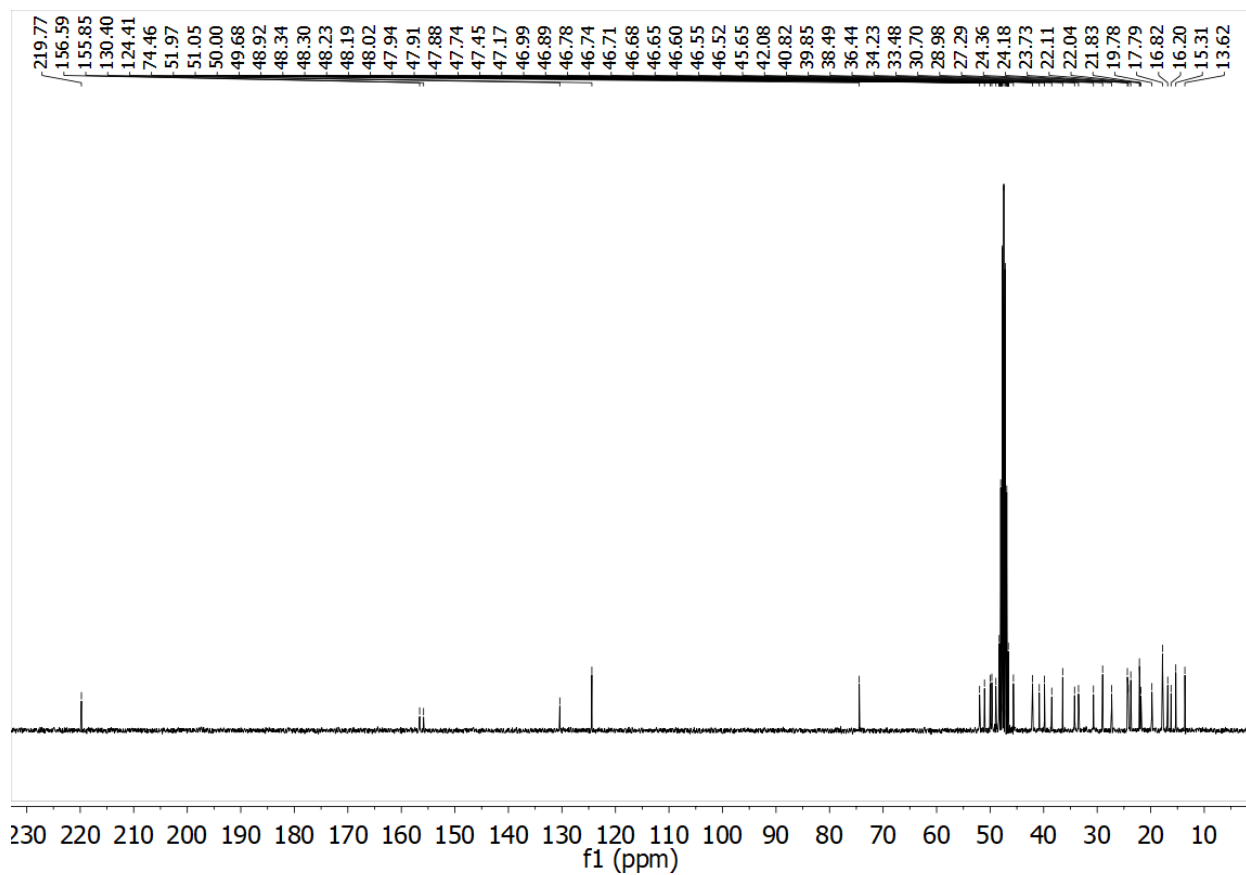


П2-28 Спектр ^1H - ^{13}C HSQC тритерпеноида (**26**)

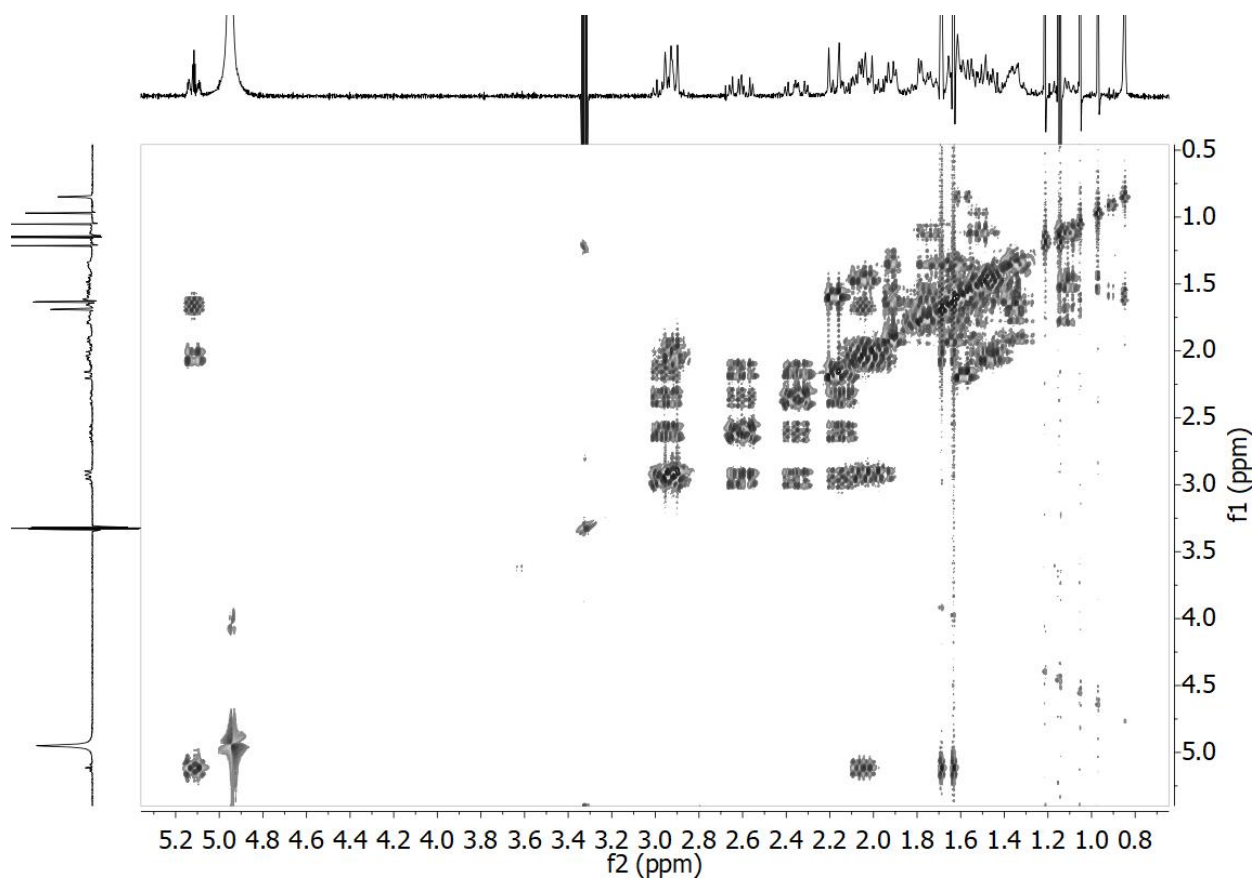
SM5
AP 1



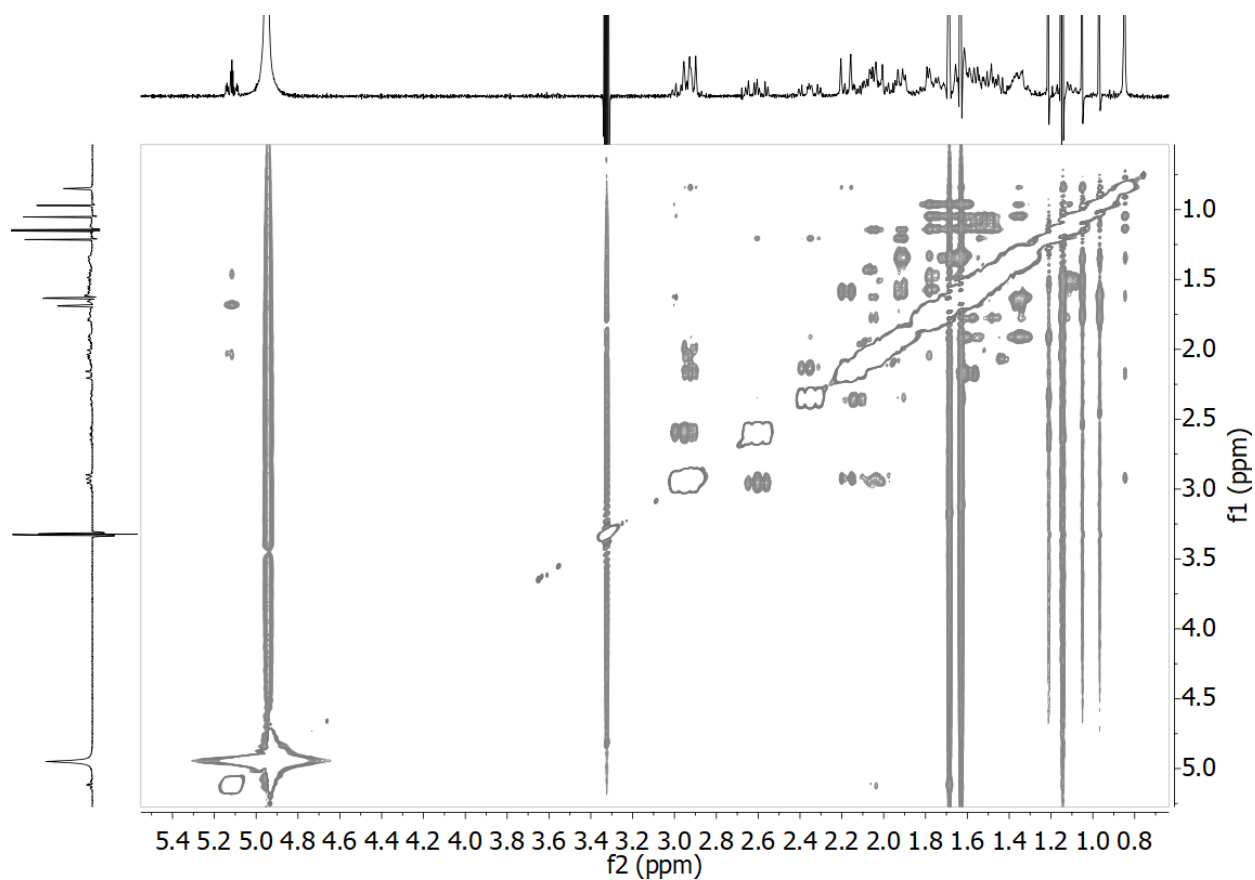
П2-29 Спектр ЯМР ^1H тритерпеноида (3)



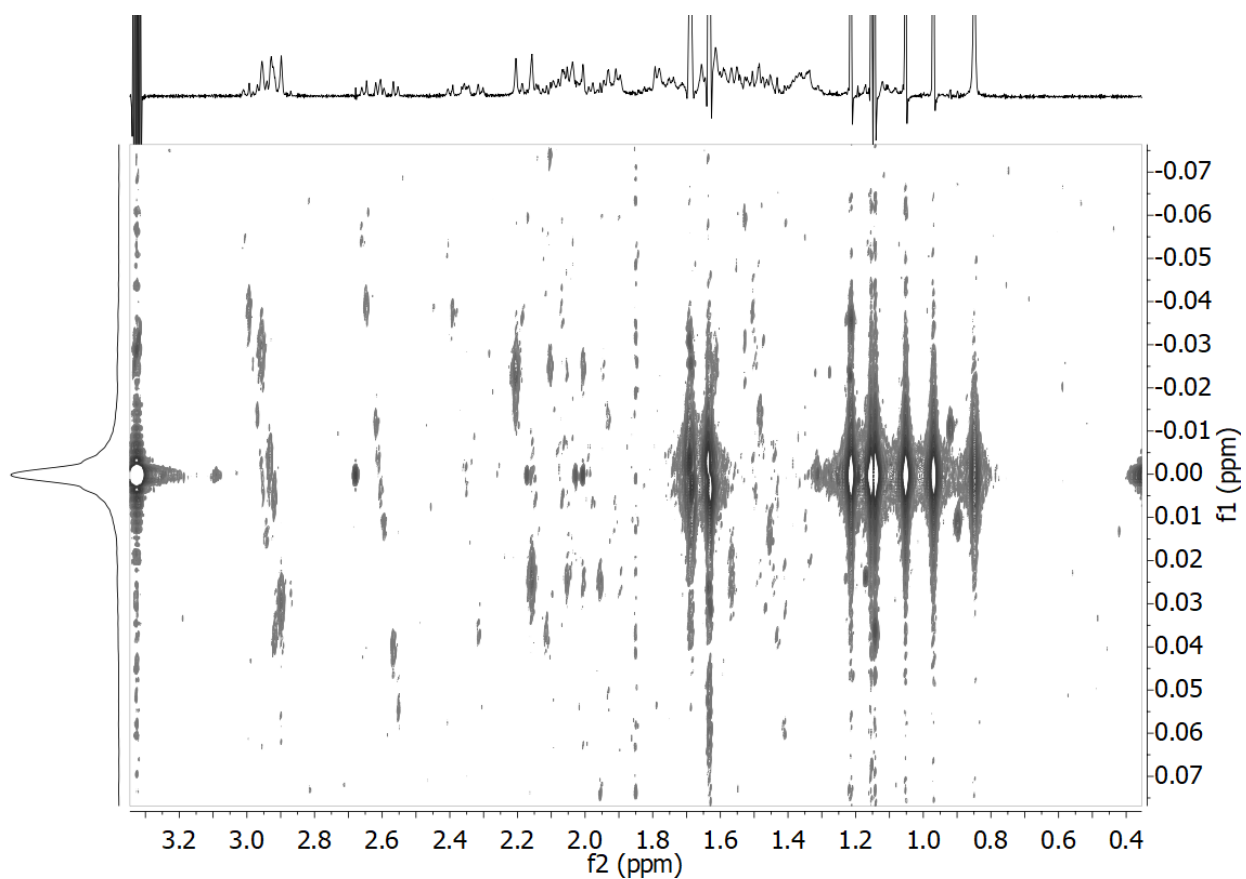
П2-30 Спектр ЯМР ^{13}C тритерпеноида (3)



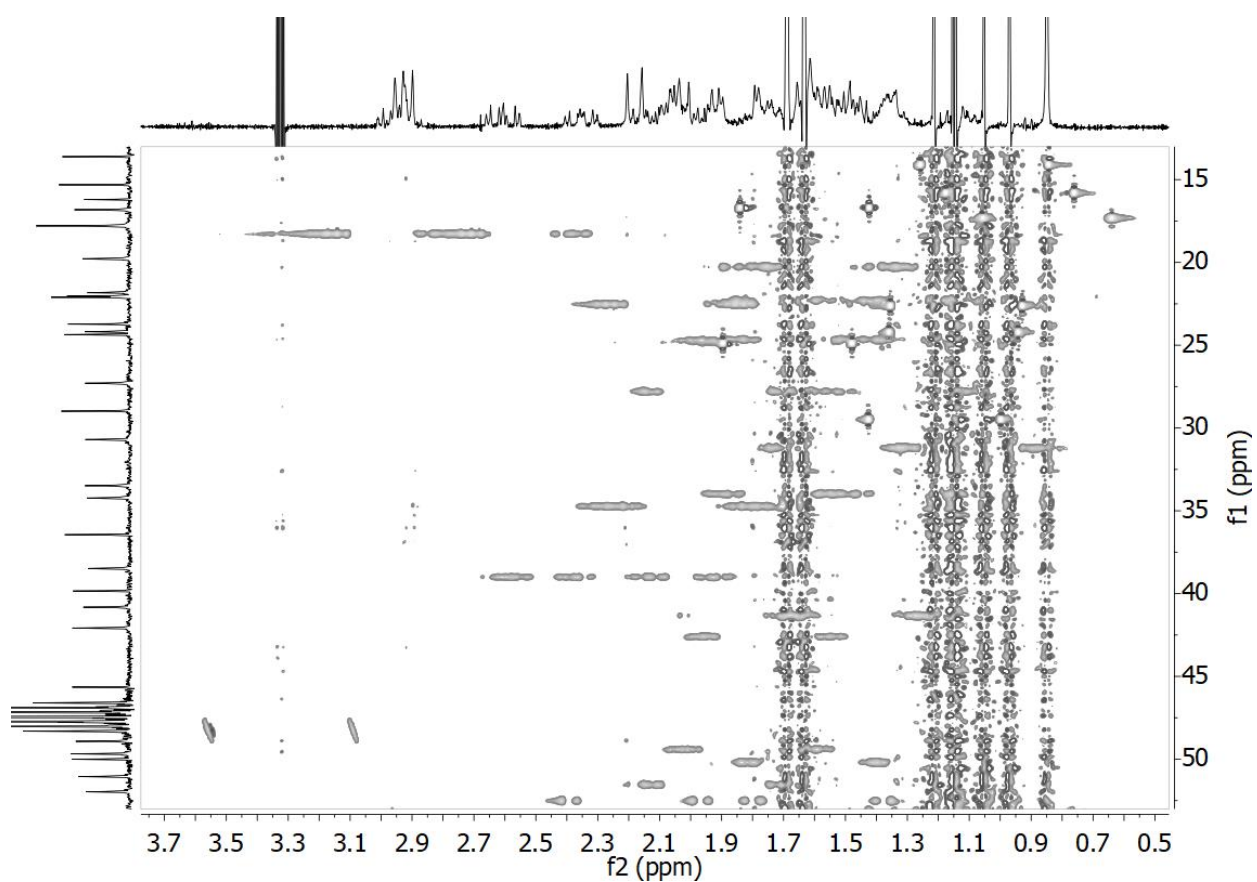
П2-31 Спектр COSY-DQF тритерпеноида (3)



П2-32 Спектр NOESY тритерпеноида (3)



П2-33 Спектр J-COSY тритерпеноида (3)



П2-34 Спектр ^1H - ^{13}C HSQC тритерпеноида (3)